



**M** 2014

# **ATIVIDADE OSTEOCLÁSTICA NA SUPERFÍCIE DE HIDROXIAPATITE NANO E MICROESTRUTURADA MODULADA PELA PRESENÇA DE INIBIDORES DA BOMBA DE PROTÕES**

**HÉLDER TIAGO GOMES SILVA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA

À FACULDADE DE ENGENHARIA DA UNIVERSIDADE DO PORTO EM  
ENGENHARIA BIOMÉDICA

Orientadores científicos:  
Professor Doutor João Miguel Rodrigues  
Professora Doutora Maria Helena Fernandes

## Resumo

No corpo humano, o osso possui várias funções físicas, como proteção, suporte e auxílio no movimento, assim como funções metabólicas, importantes na regulação da homeostasia do organismo. De modo a recuperar de uma fratura, ou a adaptar-se a forças de tensão, é necessário que o osso seja constantemente remodelado, um processo extremamente controlado, mediado por células específicas, os osteoblastos e osteoclastos.

Os osteoblastos são responsáveis pela formação de novo tecido ósseo. Quando ativos, produzem e mineralizam uma matriz proteica, denominada osteoide. Os osteoclastos estão envolvidos no processo de remodelação óssea, que acontece durante os períodos de formação e reparação do osso, através da sua função de degradação do tecido ósseo. A formação destas células começa com a proliferação de precursores osteoclásticos imaturos, e com a associação dos mesmos ao fenótipo osteoclástico. Uma vez iniciado o processo de reabsorção, os osteoclastos desenvolvem uma membrana rugosa, na qual se encontram bombas de prótons, e por onde é segregado ácido, assim como enzimas líticas, o que permite a degradação do tecido ósseo. Este processo começa com a adesão das células osteoclásticas à matriz óssea, ao que se segue a gênese de um meio extracelular entre ambos, circundado por uma zona de vedação.

Para além dos osteoblastos e osteoclastos, existem ainda outros dois tipos de células ósseas, os osteócitos e as células ósseas de revestimento. O primeiro tipo forma-se à medida que o osteoide é produzido pelos osteoblastos, quando algumas destas células são aprisionadas e incorporadas na matriz, e está encarregue da manutenção do tecido ósseo. As células ósseas de revestimento recobrem as superfícies ósseas que não se encontram em remodelação, representando uma fonte de precursores osteogénicos. Para além disso, possuem uma importante função na preservação da homeostasia mineral.

A remodelação óssea é regulada por forças mecânicas, hormonas e fatores locais. A ação coordenada entre osteoblastos e osteoclastos acontece no interior de um compartimento de remodelação óssea, cuja forma é dada por um invólucro de células ósseas de revestimento, e se localiza na área do tecido ósseo a ser remodelada. A taxa a que este processo decorre é variável de acordo com o tipo de osso, permanecendo, no entanto, estável em indivíduos saudáveis. De outro modo, podem surgir doenças ósseas, como a osteoporose e a artrite reumatoide, entre outras.

No conjunto, as células ósseas são responsáveis pela produção, mineralização, manutenção e reabsorção de tecido ósseo, desempenhando também um papel na sua fisiologia. No entanto, estas células constituem apenas uma pequena parte da composição óssea. A maior parte é representada por uma fase orgânica, composta principalmente por colagénio tipo I, e por uma fase inorgânica, composta, essencialmente, por um mineral, a hidroxiapatite (HA). Estas duas componentes, orgânica e inorgânica, são indissociáveis e interagem entre si, conferindo propriedades mecânicas ao tecido ósseo, nomeadamente resistência e elasticidade.

A composição da HA é similar à componente inorgânica do osso, representando cerca de 70% da massa óssea. Por essa razão, existe um elevado potencial de utilização

de HA sintética como substituto ósseo em aplicações biomédicas. As principais vantagens deste mineral são a biocompatibilidade, osteocondução, e o facto de não apresentar toxicidade nem desencadear uma resposta inflamatória por parte do organismo. Atualmente, as suas principais aplicações consistem no preenchimento de defeitos ósseos e no revestimento de implantes metálicos. Além disso, os materiais anteriormente utilizados para esta finalidade apresentavam várias limitações, pelo que houve a necessidade de criar biomateriais que as ultrapassassem, e que possuísem capacidades osteocondutoras e de regeneração, assim como de libertação de fármacos, de forma a produzirem um efeito terapêutico mais rápido e eficaz.

A interação entre o tecido ósseo e a superfície do biomaterial implantado é um fator importante a ser considerado, sendo desejável a formação óssea na área de contacto entre ambos. Assim, a HA nanoestruturada promove a formação de uma camada de apatite antes de interagir diretamente com o tecido ósseo a nível atómico, o que confere uma maior estabilidade. À escala nanométrica, a estrutura da HA apresenta uma elevada osteocondução, ao contrário da HA convencional, sendo a taxa de formação de novo tecido ósseo superior. Além disso, os cristais de apatite presentes no corpo humano são materiais nanoestruturados, pelo que existe uma maior pertinência na sintetização deste mineral nessa escala.

Atualmente, os inibidores da bomba de prótons (IBP) são principalmente utilizados de modo a diminuir a segregação de ácido gástrico, que ocorre através de uma bomba de prótons, uma enzima que transporta ácido das células parietais para o lúmen gastrointestinal. Estes inibidores bloqueiam a bomba de prótons, tornando possível o tratamento de doenças decorrentes de acidificação gástrica excessiva, como o refluxo ou úlceras. Por esta razão, a utilização de IBP no contexto da regeneração/metabolismo ósseo apresenta um elevado potencial de aplicação, pois a acidificação óssea promovida pelos osteoclastos, à semelhança da segregação ácida que acontece na envoltente gástrica, requer o envolvimento de bombas de prótons transmembranares.

## Abstract

In the human body, bone tissue is responsible for several physical functions, like protection, support and motion aid, as well as metabolic functions, important to the organism homeostasis regulation. In order to recover from a fracture, or to adapt to stress forces, it is necessary that the bone undergoes constant remodeling, an extremely controlled process, guided by specific cells, osteoblasts and osteoclasts.

Osteoblasts are in charge of the synthesis of new bone tissue. When active, these cells produce and mineralize a protein matrix, known as osteoid. Osteoclasts are involved in the bone remodeling process, which takes place during the bone growth and repair periods, through their bone tissue-degrading function. The shaping of these cells begins with the proliferation of immature osteoclastic precursors, and their association to the osteoclastic phenotype. Once the resorption process is initiated, osteoclasts develop a ruffled border membrane, which presents proton pumps, and through which acid and lytic enzymes are secreted, allowing bone tissue dissolution. This process begins with osteoclastic attachment to the bone matrix, followed by the genesis of an extracellular environment between them, surrounded by a sealing zone.

Besides osteoblasts and osteoclasts, there are two other types of bone cells, osteocytes and bone lining cells. The first type evolves as osteoid is produced by osteoblasts, when some of these cells are trapped and incorporated in the matrix, and is responsible for bone tissue maintenance. Bone lining cells overlay surfaces that are not undergoing remodeling, being a source of osteogenic precursors. Besides, these cells have an important role on the mineral homeostasis preservation.

Bone remodeling is regulated by mechanical forces, hormones and local factors. The coordinated action between osteoblasts and osteoclasts takes place inside a bone remodeling compartment, shaped by a bone lining cells coverture, and located over the bone tissue area to be remodeled. The rate at which this process takes place varies according to the bone type, remaining, however, stable in healthy individuals. Otherwise, bone diseases, such as osteoporosis and arthritis, among others, may occur.

As a whole, bone cells produce, mineralize, maintain and reabsorb bone tissue, playing also a role in its physiology. However, these cells constitute only a minor part of bone composition. The main part consists of an organic phase, mostly composed of type I collagen, and an inorganic phase, essentially composed of a mineral, hydroxyapatite. The two components, organic and inorganic, are indissociable and interact with each other, bestowing mechanical properties to the bone tissue, namely resistance and elasticity.

Hydroxyapatite composition is similar to the inorganic component of the bone, representing approximately 70% of bone mass. For this reason, there is a high utilization potential of synthetic hydroxyapatite as a bone replacement in biomedical applications. The main advantages of this mineral consist on biocompatibility, osteoconduction, and the fact that it does not present toxicity nor causes an inflammatory response by the organism. Currently, it is mainly applied to fill bone defects, and to coat metallic implants. Besides, the materials previously utilized for this purpose presented several limitations, thus making it necessary to create biomaterials

that could overcome them, and that displayed osteoconductive and regenerative capacities, as well as drug releasing properties, in order to produce a faster and more efficient therapeutic effect.

It is important to consider the interaction between bone and the implanted biomaterial surface, being desirable the formation of new bone tissue in the contact area between both. Thus, nanostructured hydroxyapatite promotes the generation of an apatite layer before directly interacting with bone at an atomic level, granting a better stability. At nanometric scale, hydroxyapatite structure presents high osteoconduction, as opposed to conventional hydroxyapatite, causing new bone tissue formation rate to be much higher. Besides, apatite crystals found in the human body are nanostructured materials, for which the synthesis of this mineral in the same scale appears to be more pertinent.

Currently, proton pump inhibitors are mostly used to decrease gastric acid secretion, which occurs through a proton pump, an enzyme that carries acid from the parietal cells to the gastrointestinal lumen. These inhibitors block the proton pump, allowing the treatment of diseases related with excessive gastric acidification, like reflux or ulcers. Due to this fact, the use of proton pump inhibitors in the bone regeneration/metabolism context reveals a high application potential, for the osteoclast-promoted bone acidification, similarly to the gastric acid secretion, requires the involvement of transmembranar proton pumps.

## Lista de Abreviaturas

$\alpha$ -MEM - *Alpha modified minimum essential medium*

ATPase  $H^+/K^+$  - adenosina trifosfatase hidrogénio-potássio

BLC – células ósseas de revestimento

BMP – proteínas ósseas morfogenéticas

BMU – unidade multicelular básica

BRC – compartimento de remodelação óssea

ClC-7 - *chloride channel 7*

$C_{max}$  – concentração máxima

CTR – recetor de calcitonina

DRX - difração de raios-X

FTIR - *Fourier transform infrared spectroscopy*

GH - hormona do crescimento

HA - Hidroxiapatite

IBP - inibidores da bomba de protões

IL-1 - interleucina-1

IVS – inibidores das vias de sinalização

JNK – c-Jun N-terminal kinase

MAPK - *mitogen-activated protein kinase*

M-CSF - *macrophage colony-stimulating factor*

MEV - microscopia eletrónica de varrimento

MEK – MAPK/ERK kinases

mHA – hidroxiapatite microestruturada

MMP – metaloproteinases da matriz

MSC – células estaminais mesenquimais

NF- $\kappa$ B - *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

nHA – hidroxiapatite nanoestruturada

OPG – osteoprotegerina

PBMC – células mononucleadas de sangue periférico humano

PGE<sub>2</sub> - prostaglandina E<sub>2</sub>

PTH - hormona da paratiroide

RANK - *receptor activator of nuclear factor kappa-B*

RANKL - *receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*

TNF - *tumor necrosis factor*

TRAP - *tartrate-resistant acid phosphatase*

VNR – recetor de vitronectina



**Lista de Figuras**

Figura 1 ..... 2

Figura 2 ..... 3

Figura 3 ..... 4

Figura 4 ..... 5

Figura 5 ..... 8

Figura 6 ..... 11

Figura 7 ..... 13

Figura 8 ..... 14

Figura 9 ..... 17

Figura 10 ..... 21

Figura 11 ..... 22

Figura 12 ..... 24

Figura 13 ..... 27

Figura 14 ..... 29

Figura 15 ..... 31

Figura 16 ..... 33

Figura 17. .... 38

Figura 18. .... 38

Figura 19 ..... 39

Figura 20. .... 41

Figura 21. .... 44

Figura 22. .... 45

Figura 23. .... 46

Figura 24. .... 47

Figura 25 ..... 48

Figura 26 ..... 49

Figura 27 ..... 50

Figura 28. .... 51

Figura 29. .... 53

Figura 30. .... 54

Figura 31. .... 55

Figura 32. .... 56

Figura 33. .... 57

**Lista de Tabelas**

Tabela 1 ..... 25

Tabela 2..... 40

## Índice

<i>Parte 1</i> .....	1
Introdução – O osso .....	2
Estrutura óssea .....	2
Fisiologia do osso.....	6
Estrutura molecular .....	7
Células ósseas.....	9
Ciclo de Remodelação Óssea .....	10
Osteoclastos.....	12
Reabsorção osteoclástica.....	12
Osteoclastogénese .....	15
Fatores que influenciam a osteoclastogénese .....	16
Biomateriais .....	18
Requisitos .....	18
Tipos de biomateriais .....	19
Polímeros.....	19
Cerâmicas .....	19
Metálicos .....	20
Compósitos.....	20
Osteointegração.....	22
Hidroxiapatite.....	23
Obtenção e caracterização da Hidroxiapatite .....	24
Aplicações .....	25
Hidroxiapatite Nanoestruturada .....	26
Inibidores da bomba de prótons .....	28
Omeprazol.....	30
Mecanismo de ação .....	30
Bomba de prótons osteoclástica (ATPase Vacuolar) .....	32
Estrutura .....	32
Efeito dos IBP no tecido ósseo.....	34
Conclusão .....	35

<i>Parte 2</i> .....	36
Introdução .....	37
Materiais e métodos .....	38
Preparação das pastilhas de HA micro e nanoestruturadas .....	38
Culturas de precursores osteoclásticos .....	40
Isolamento de células mononucleadas de sangue periférico humano .....	40
Culturas celulares .....	40
Quantificação da atividade da TRAP .....	42
Quantificação do ADN.....	42
Microscopia Ótica Confocal.....	42
Microscopia Eletrónica de Varrimento .....	43
Quantificação do $\text{Ca}^{2+}$ extracelular .....	43
Resultados .....	44
Caracterização da diferenciação osteoclástica das culturas de PBMC na presença de IBP ....	44
Quantidade total de ADN.....	44
Atividade da TRAP .....	46
Apoptose .....	48
Caracterização do envolvimento das vias de sinalização na resposta celular na presença de IBP .....	50
Quantidade total de ADN.....	50
Atividade da TRAP .....	53
Caracterização da capacidade de reabsorção de HA .....	55
Visualização das culturas celulares por Microscopia Eletrónica de Varrimento .....	56
Visualização das culturas celulares por Microscopia Ótica Confocal.....	57
Visualização de células com anéis de actina e expressão de VNR e CTR.....	57
Discussão.....	58
Conclusão.....	64
Referências .....	65

## ***Parte 1***

## Introdução – O osso

O osso é um tecido conjuntivo especializado, endurecido por mineralização com fosfato de cálcio na forma de hidroxiapatite. As suas funções são providenciar forma, proteção e suporte corporal, e ainda auxiliar a locomoção.<sup>[1]</sup> Serve de ponto de inserção para músculos, tendões e ligamentos, que suportam a postura e movimento de todo o corpo humano. Para além disso, possui ainda a função de armazenamento de sais minerais, em particular de cálcio, e constitui o local de realização da hematopoiese (medula óssea).<sup>[2]</sup>

O tecido ósseo é bastante dinâmico, encontrando-se sujeito a uma remodelação permanente, o que permite que o osso seja reparado após uma fratura, ou que se adapte a forças de tensão. A taxa de remodelação óssea é bastante elevada durante a infância, um período no qual a formação excede a reabsorção, decaindo com o processo de envelhecimento, onde se verifica perda óssea. Por conseguinte, é necessário que este processo fisiológico seja altamente regulado, de modo que a robustez do osso seja mantida.<sup>[1]</sup>

## Estrutura óssea

O osso pode ser classificado, segundo o seu tipo histológico, em osso cortical, também designado por córtex (compacto), o qual apresenta uma estrutura ordenada e densa, e osso trabecular (esponjoso ou *cancellous*) que, pelo contrário, possui uma estrutura desordenada e menos compacta<sup>[1]</sup>, consistindo em ramificações e anastomoses ósseas (trabéculas).<sup>[2]</sup> Os ossos podem ainda ser divididos, de acordo com a sua forma, em longos (*e.g.* fémur) ou chatos (*e.g.* omoplata) (Figura 1).

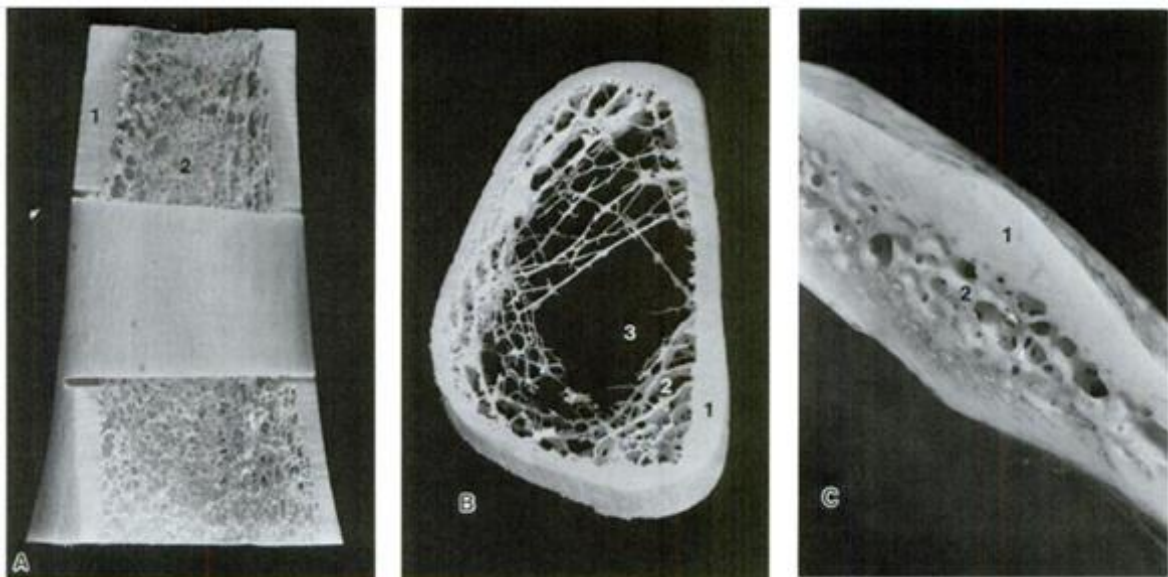


Figura 1 – Estrutura óssea. A) Secção longitudinal de um osso longo: 1 – córtex; 2 – osso esponjoso. B) Secção transversal de um osso longo: 1 – córtex; 2 – osso esponjoso; 3 – cavidade medular. C) Secção transversal de um osso chato: 1 – córtex; 2 – osso esponjoso.<sup>[2]</sup>

O osso cortical encontra-se principalmente no eixo dos ossos longos e na superfície dos ossos chatos. A sua estrutura seccionada contém células, canais (Haversian), vasos sanguíneos e linfáticos, nervos, tecido conjuntivo e uma complexa matriz laminada.<sup>[1]</sup>

Os canais Haversian (Figura 2) possuem um padrão reconhecível em seu redor. Envolvendo cada um destes canais, existem lamelas concêntricas (lamelas Haversian ou *lamellae*), dentro das quais se encontram pequenas lacunas (*lacunae*), que contêm osteócitos, e que se encontram ligadas entre si através de canaliculos (anastomoses). A estrutura formada pelos canais Haversian e pelas suas lamelas é conhecida por Sistema Haversian ou *osteon*. Estes sistemas possuem nervos e vasos sanguíneos que mantêm as células ósseas, e estão organizados segundo linhas de tensão mecânica, possuindo a capacidade de se realinharem se houver uma alteração nos padrões da mesma. Esta propriedade é conhecida por Lei de Wolf.<sup>[2]</sup>

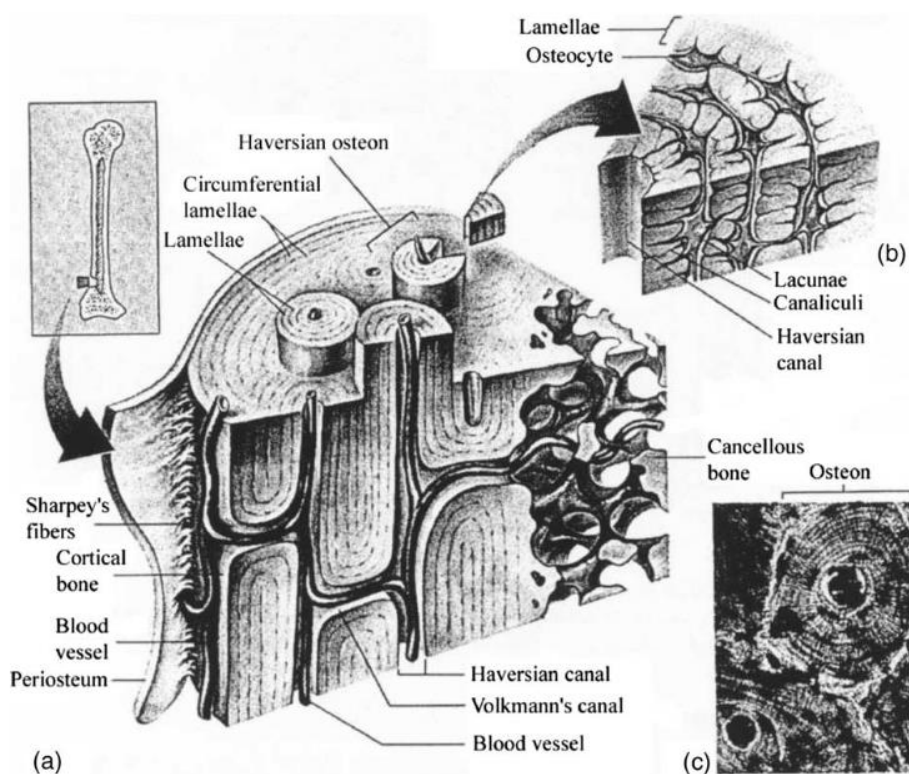


Figura 2 – Estrutura do osso cortical (a), onde é possível observar o sistema Haversian (b) e a sua vista seccionada superior (c).<sup>[162]</sup>

É possível encontrar o osso trabecular principalmente na epífise dos ossos longos e no interior dos ossos chatos. A sua estrutura consiste em placas interligadas, o que lhe confere uma grande robustez, e torna este tipo de osso particularmente adaptado ao suporte de forças compressivas, razão pela qual é o tipo de osso predominante nos vertebrados.<sup>[1]</sup>

No geral, cada osso possui uma camada exterior de osso cortical, que envolve uma camada interior de osso trabecular e, finalmente, uma cavidade interna (Figura

3).<sup>[1]</sup> Nos ossos longos, esta cavidade consiste num canal, onde se encontra a medula óssea, sendo possível observar osso esponjoso (*cancellous*) junto às suas extremidades. Do mesmo modo, os ossos chatos apresentam uma estrutura composta pelo córtex e osso esponjoso, mas o seu interior está completamente preenchido, ou seja, não exibe cavidade medular. Em idades avançadas, o osso esponjoso pode mesmo desaparecer, devido ao colapso das superfícies corticais.<sup>[2]</sup>

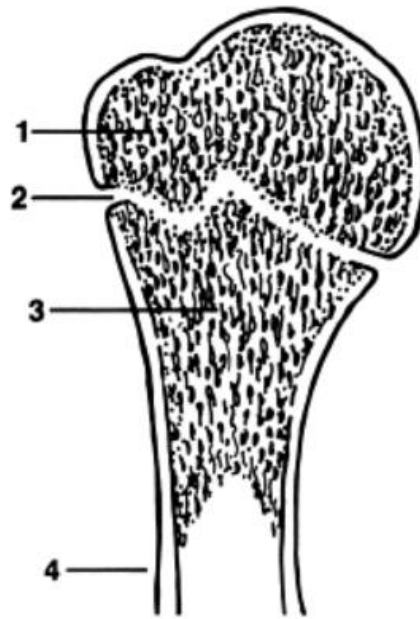


Figura 3 – Esquema da secção sagital de um osso longo: 1 – epífise; 2 – placa epifiseal; 3 – metáfise; 4 – diáfise. O osso cortical é encontrado principalmente na zona da diáfise, enquanto o osso esponjoso se localiza junto à epífise.<sup>[2]</sup>

Para além das superfícies articulares, protegidas por cartilagem<sup>[2]</sup>, todos os ossos se encontram envolvidos, quer na superfície interna, quer externa, por uma membrana de tecido conjuntivo. Externamente, esta membrana é denominada por perióstio<sup>[2]</sup>, o qual é constituído por duas camadas fibrosas, apresentando a camada mais interior um potencial osteogénico que leva à formação de novo tecido ósseo, um processo designado por aposição periosteal.<sup>[1]</sup>

A superfície interna, presente nas cavidades medulares, é revestida pelo endóstio<sup>[2]</sup>, onde se inicia a reabsorção óssea, por oposição ao perióstio. Ambas as membranas possuem células que participam no metabolismo ósseo, os osteoblastos e osteoclastos, que desempenham a função de formação e reabsorção óssea, respetivamente, de modo a executar a remodelação, crescimento e reparação óssea (Figura 4).<sup>[1]</sup>

A cavidade medular e os espaços intertrabeculares no osso esponjoso contêm medula óssea, responsável pela produção de células sanguíneas. Esta cavidade pode ainda ter a função de armazenamento de gordura, sendo nesse caso denominada por medula amarela.<sup>[2]</sup>



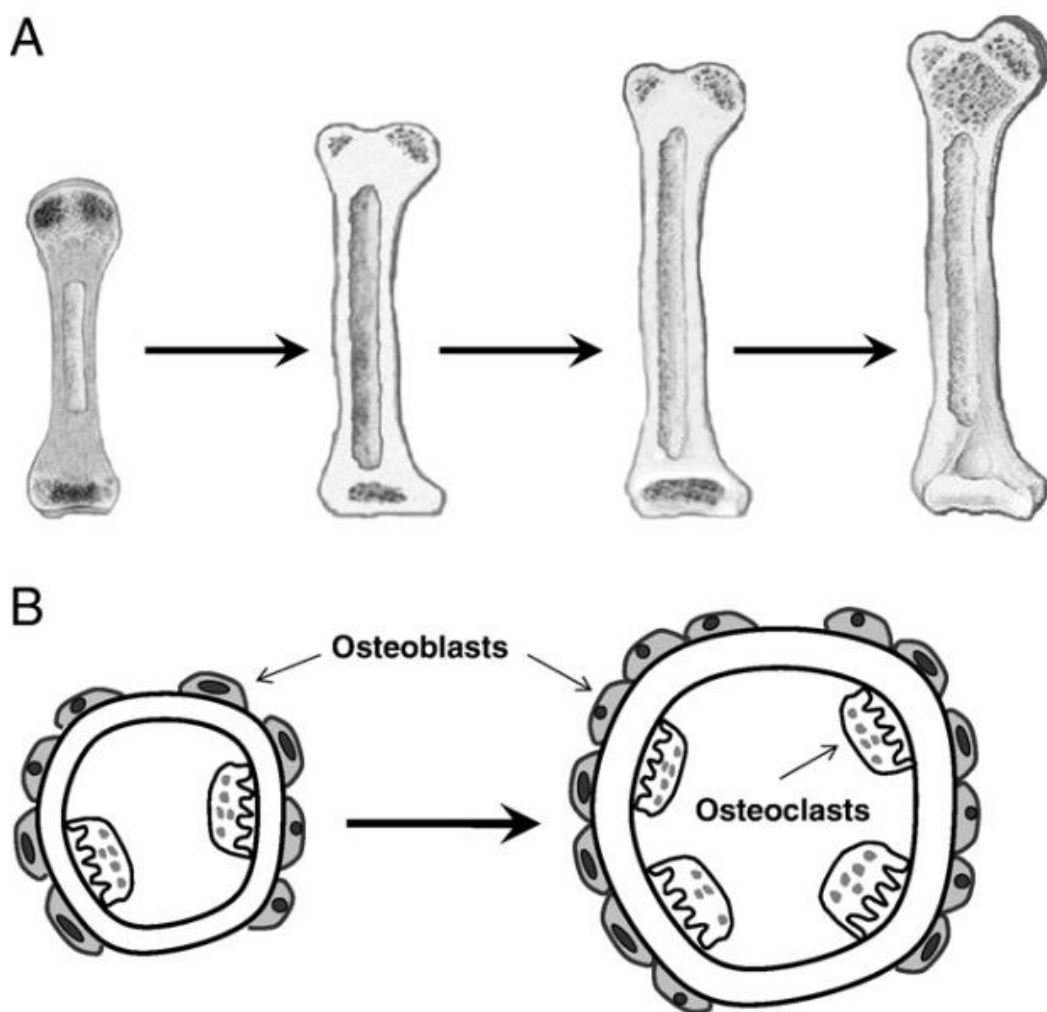


Figura 4 - A reabsorção óssea é efetuada pelos osteoclastos na superfície interna do osso (endóstio), sendo a formação realizada na superfície externa (perióstio), o que permite a remodelação, crescimento e reparação óssea.<sup>[163]</sup>

## Fisiologia do osso

Encontram-se, no osso, minerais essenciais para diversas funções metabólicas. O cálcio tem um papel fundamental na coagulação sanguínea, na contração do músculo cardíaco e do músculo esquelético e, ainda, na função nervosa. Por sua vez, o fósforo é importante na composição dos ácidos nucleicos e fosfolípidos.<sup>[2]</sup>

A parte mineral do tecido ósseo é majoritariamente constituída por HA<sup>[3]</sup>, podendo ainda ser encontradas pequenas quantidades de sódio, magnésio, fluoreto, carbonatos e silício. A concentração de sais permanece em equilíbrio, ou seja, a quantidade de cálcio absorvida pelo organismo é, aproximadamente, a mesma libertada pelo tecido ósseo, permitindo a substituição constante dos minerais ósseos. Este mineral é absorvido no trato intestinal, através de transporte ativo por ação da vitamina D, podendo níveis baixos desta vitamina provocar problemas ósseos, como mineralização insuficiente, raquitismo e osteomalácia.<sup>[2]</sup>

A concentração de cálcio no organismo é, também, controlada pela hormona da paratiroide (PTH)<sup>[3]</sup>, que atua diretamente no osso, diminuindo a concentração de fosfatos no plasma, através da excreção urinária. O funcionamento reduzido da glândula da paratiroide causa uma diminuição da atividade osteoclástica e um decréscimo dos níveis de cálcio. Pelo contrário, se esta glândula se encontrar demasiadamente ativa, a reabsorção óssea atinge valores exagerados, enfraquecendo o osso, e podendo originar fraturas, descalcificação e tumores ósseos.<sup>[2]</sup> Também a calcitonina desempenha funções na regulação da atividade osteoclástica, reduzindo a ação dos osteoclastos e promovendo a diminuição dos níveis de cálcio e fosfato no sangue.<sup>[3]</sup>

Assim, a regulação dos níveis de cálcio é de extrema importância. Um decréscimo de 30% nos seus valores normais induz contrações tetânicas, devido à descarga elétrica que sucede no sistema nervoso central e periférico, o que pode ser fatal. Pelo contrário, se os níveis de cálcio apresentarem valores demasiadamente elevados, dá-se uma diminuição dos reflexos e da atividade geral do sistema nervoso central. Mesmo uma elevação moderada destes níveis pode conduzir à formação de cálculos renais, cuja constituição assenta em fosfato de cálcio e, consequentemente, a uma falha renal.<sup>[2]</sup>

## Estrutura molecular

A estrutura molecular do osso desempenha um papel crucial nas suas funções estruturais e biológicas<sup>[4][5]</sup>. As células ósseas constituem aproximadamente 20% desta estrutura, sendo o resto do tecido ósseo um material compósito, formado por uma fase orgânica reforçada com uma fase mineral inorgânica.<sup>[6]</sup> A primeira é constituída maioritariamente por colagénio tipo I, com fibrilas orientadas predominantemente em paralelo relativamente umas às outras, e que suportam a matriz onde os cristais minerais se podem formar (Figura 5).<sup>[4]</sup> O colagénio constitui uma parte importante da estrutura óssea, pois a orientação das suas fibrilas resulta na formação do osso lamelar (arranjo concêntrico no osso cortical, e paralelas entre si no osso trabecular). No caso do osso não remodelado (*woven bone*), formado durante a maturação do esqueleto e em algumas patologias, as fibrilas de colagénio estão dispostas aleatoriamente.<sup>[1]</sup> Fazem ainda parte da fase orgânica, proteoglicanos e glicoproteínas adesivas.<sup>[7]</sup> A matriz inorgânica possui iões fosfato, cálcio e, em menor quantidade, bicarbonato, magnésio, potássio, sódio e citrato. A junção do fosfato e do cálcio dá origem a cristais de HA, que se situam entre as ligações cruzadas das fibrilas de colagénio e nas terminações dessas mesmas fibrilas.<sup>[4]</sup>

Tanto os componentes orgânicos como inorgânicos da matriz óssea, assim como as interações entre si, contribuem para as propriedades mecânicas do osso, tais como a sua resistência e elasticidade.<sup>[4][7]</sup>

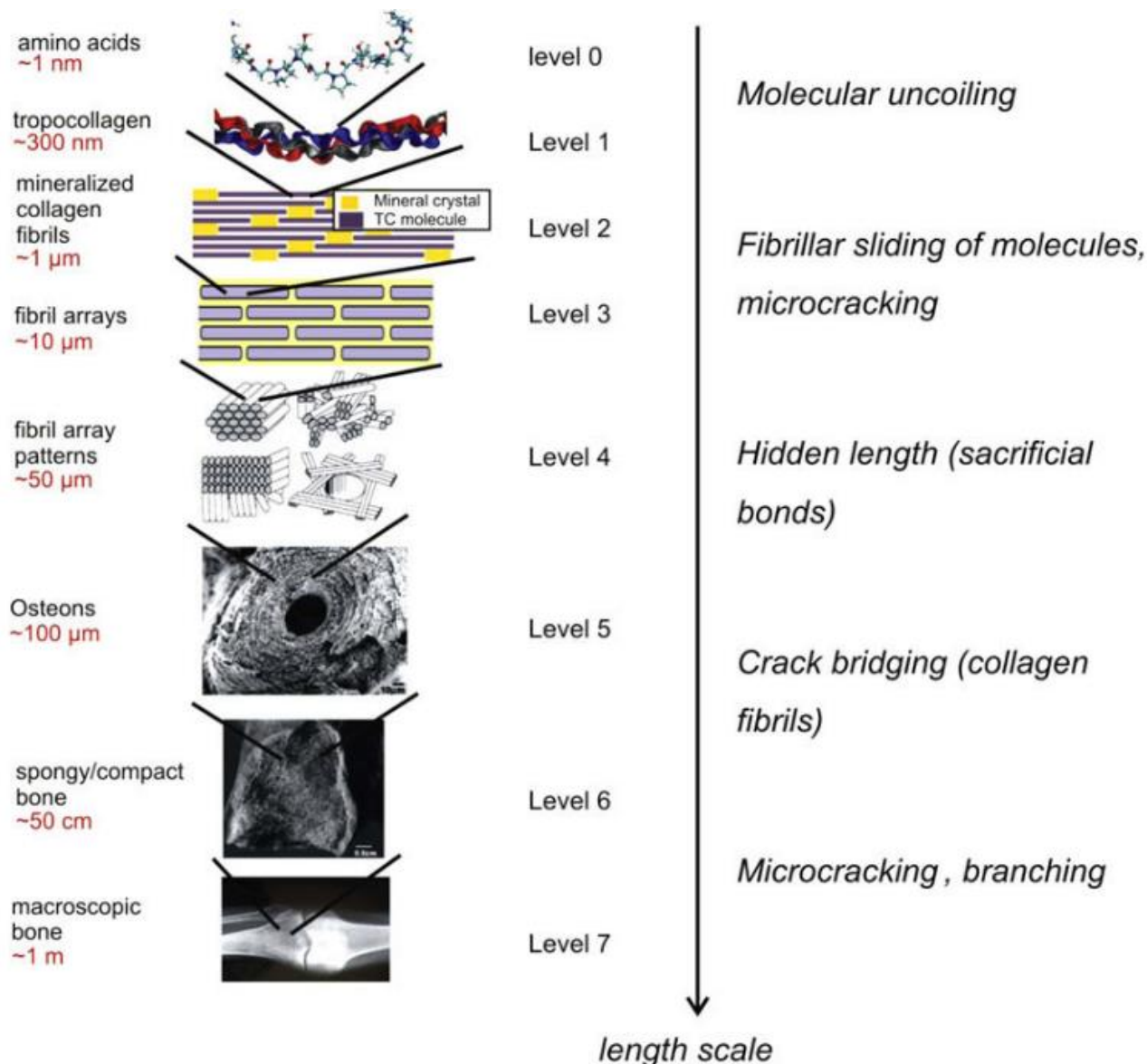


Figura 5 – Estrutura multiescalar hierárquica do osso, onde se encontram inseridas as fibrilas de colagénio da fase orgânica da matriz óssea.<sup>[164]</sup>

Fazem também parte da matriz óssea proteínas não colagénicas, distribuídas aleatoriamente, como a osteocalcina e a sialoproteína óssea, e a osteonectina e osteopontina, assim como proteínas derivadas do sangue, que se ligam ao osso devido à sua afinidade com os cristais minerais, como a albumina e imunoglobulinas.<sup>[8]</sup>

As proteínas ósseas morfogenéticas (*bone morphogenetic proteins* - BMP) são um tipo de glicoproteínas responsável pela indução óssea<sup>[9][10]</sup>, podendo encontrar-se, não só no tecido ósseo, como em outros tecidos corporais.<sup>[11]</sup> Estas proteínas possuem a função de modular o desenvolvimento esquelético durante a embriogénese<sup>[10]</sup>, devido à sua grande capacidade de indução da diferenciação osteoblástica, a partir de células mesenquimais progenitoras. Na fase embrionária, estão envolvidas na regulação de alguns processos de desenvolvimento da cartilagem e osso<sup>[11]</sup> e, na fase adulta, dirigem a proliferação, diferenciação e apoptose de células mesenquimais e células ósseas, entre outras.<sup>[10]</sup>

## Células ósseas

As células ósseas são classificadas de acordo com a sua forma, função e localização, existindo quatro tipos celulares: osteoblastos, osteoclastos, osteócitos e células ósseas de revestimento (*bone lining cells* – BLC) (Figura 6). Em conjunto, estas células executam cinco tarefas gerais: produção de proteínas ósseas; estimulação da mineralização da matriz óssea; manutenção do tecido ósseo; reabsorção óssea; e desempenho de funções na fisiologia mineral.<sup>[12]</sup>

Os osteoblastos são responsáveis pela formação de tecido ósseo. Estas células mononucleadas podem ser encontradas no osso, intimamente associadas ao perióstio e endóstio. Quando ativos, os osteoblastos produzem uma matriz proteica, denominada osteoide, encontrando-se envolvidos na mineralização da mesma.<sup>[2]</sup>

À medida que o osteoide é produzido pelos osteoblastos, algumas destas células são aprisionadas e incorporadas na matriz óssea, tornando-se osteócitos. Estes têm a função de manutenção do tecido ósseo, sendo acondicionados dentro de lacunas e canalículos localizados no osso lamelar.<sup>[2]</sup> Nos estágios primários do seu ciclo de vida, os osteócitos podem estar ativos no processo de mineralização do osso. Porém, na fase madura, deixam de apresentar essa capacidade.<sup>[12]</sup>

Os osteoclastos são células grandes e multinucleadas, responsáveis pela degradação do tecido ósseo. Estão envolvidos na remodelação óssea durante a fase de crescimento e reparação, bem como nos processos destrutivos levados a cabo para a remoção de tecido ósseo.<sup>[2]</sup>

As células ósseas de revestimento recobrem as superfícies inativas do osso, ou seja, as superfícies que não se encontram em remodelação. No entanto, estas células também podem ser induzidas a proliferar e a diferenciarem-se em células osteogénicas diferentes, podendo representar uma fonte de precursores osteogénicos.<sup>[10]</sup> Devido ao facto de a ativação da remodelação óssea ocorrer em superfícies ósseas inativas, as BLC podem estar envolvidas na propagação dos sinais que iniciam a reabsorção e remodelação óssea. Também é reconhecida a sua importância na homeostasia mineral, através da manutenção dos fluidos ósseos e do fluxo iónico existente entre o osso e o espaço intersticial.<sup>[11]</sup>

## Ciclo de Remodelação Óssea

A remodelação óssea é executada pela unidade multicelular básica (*basic multicellular unit* - BMU) do osso, constituída por osteócitos, osteoclastos e osteoblastos, sendo a sua atividade regulada por forças mecânicas, hormonas, tais como a hormona da paratiroide e hormona do crescimento (*growth hormone* - GH), citocinas e fatores locais.<sup>[1]</sup>

A ação coordenada dos osteoclastos e osteoblastos acontece dentro de um compartimento de remodelação óssea (*bone remodeling compartment* – BRC), que se forma quando os osteócitos respondem a um estímulo fisiológico (*e.g.* hormonas), ou físico (*e.g.* danos estruturais), levando à formação de uma cobertura de células de revestimento sobre o osso a ser remodelado. Os capilares da medula óssea penetram nesta cobertura, fornecendo um canal para que células e nutrientes possam entrar neste meio (Figura 6).<sup>[12]</sup>

Após o estímulo biomecânico inicial, e consequente ativação da remodelação por ação dos osteócitos, dá-se a retração das células de revestimento da superfície endosteal, assim como a digestão da membrana do endósteo, através de metaloproteinases da matriz (*matrix metalloproteinases* - MMP). Em seguida, são recrutados e ativados precursores osteoclásticos, os quais se fundem, tornando-se multinucleados, e atuam como mediadores da reabsorção óssea. Após este processo, os osteoblastos reúnem-se na cavidade de reabsorção, segregando osteoide, o que origina novo tecido ósseo após mineralização.<sup>[1]</sup>

A taxa de remodelação é variável de acordo com o tipo de osso, sendo maior em zonas de osso trabecular, e menor em zonas onde predomina o osso cortical. Após a degradação óssea, os osteoclastos são substituídos por osteoblastos que, em indivíduos saudáveis, restauram completamente o osso previamente degradado.<sup>[13]</sup> A ação dos osteoclastos e osteoblastos está estreitamente relacionada, pelo que a massa óssea de um adulto são permanece estável. Se tal não acontecer, e a atividade osteoclástica for excessiva, podem ocorrer doenças como a osteoporose, doença de Paget, metástases osteolíticas e artrite.<sup>[1]</sup> No caso do processo de envelhecimento, a quantidade de tecido ósseo depositada na lacuna de reabsorção, através da ação osteoblástica, é inferior à removida pelos osteoclastos. Este balanço negativo é o principal responsável pela perda óssea que se verifica com a idade.

Ainda assim, os fatores responsáveis pelo aparecimento sequencial dos osteoclastos e osteoblastos nos locais de remodelação óssea, o seu papel individual no processo, e os mecanismos subjacentes à sua produção, permanecem por elucidar.<sup>[13]</sup>

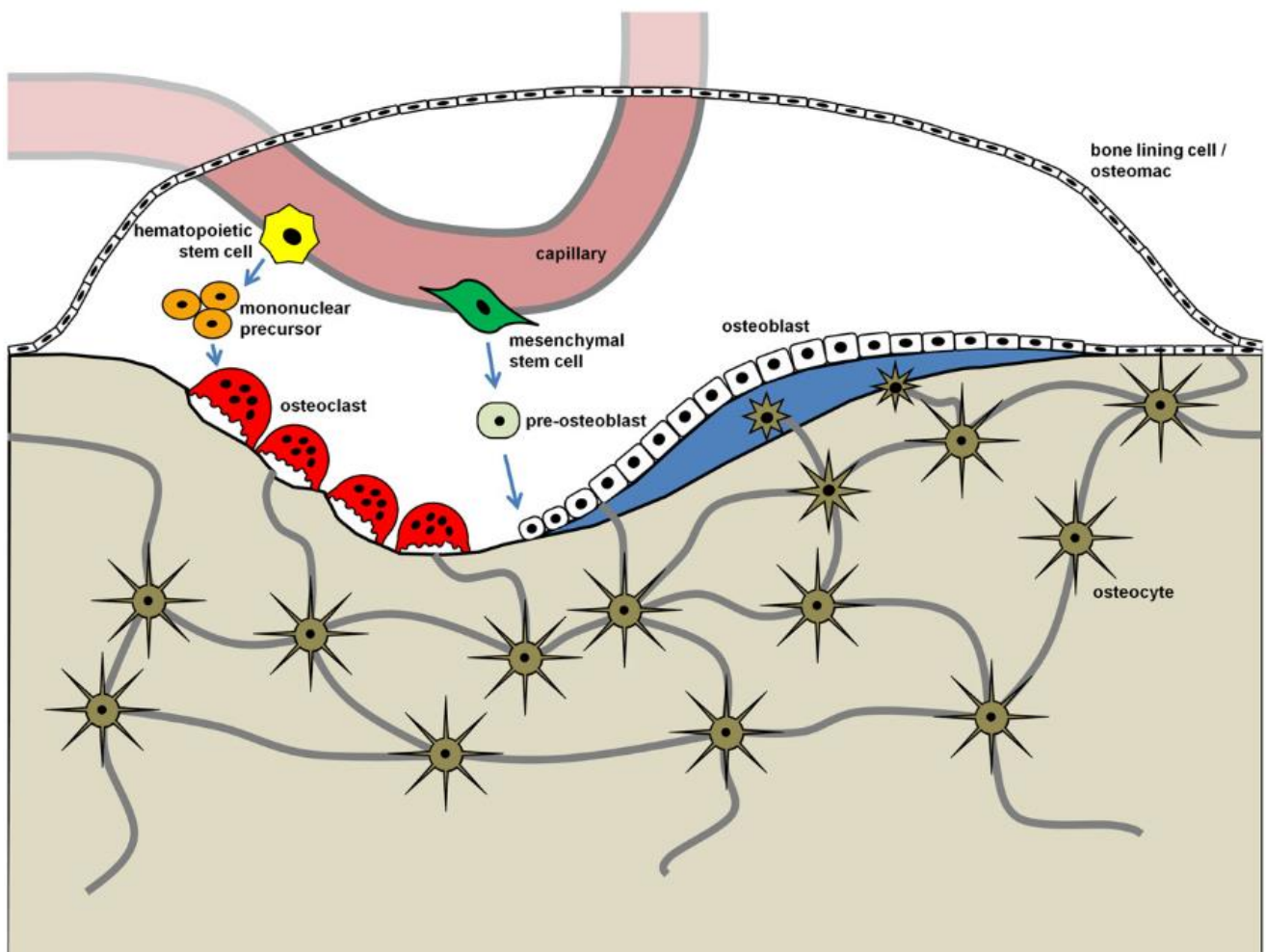


Figura 6 –Diagrama da unidade multicelular básica (*basic multicellular unit* - BMU) no interior do compartimento de remodelação óssea (*bone remodeling compartment* - BRC).<sup>[165]</sup>

## Osteoclastos

Os osteoclastos são células multinucleadas de grandes dimensões, formadas a partir da fusão de progenitores mononucleares da família dos monócitos/macrófagos. São responsáveis pela reabsorção óssea, desempenhando um papel fundamental na formação e manutenção do esqueleto.<sup>[13]</sup>

A estabilidade mecânica e homeostasia fisiológica dependem da remodelação efetuada por estas células, capazes de degradar, tanto a parte mineral, como a parte orgânica da matriz óssea. A sua característica funcional mais distinta é a capacidade de dissolverem a matriz mineralizada, através da segregação de ácido por uma bomba de prótons.<sup>[14]</sup>

## Reabsorção osteoclástica

A reabsorção óssea começa com a proliferação de precursores osteoclásticos imaturos, e com a sua subsequente fusão, terminando com a degradação das fases orgânica e inorgânica do osso, através de osteoclastos maduros.<sup>[15]</sup> Uma vez iniciado este processo, ocorre a formação de uma membrana rugosa nos osteoclastos, através da qual se efetuam a degradação e reabsorção do tecido ósseo, e cuja forma se deve ao transporte de vesículas ácidas, desde o interior das células osteoclásticas, até à sua membrana plasmática, onde são projetadas, num processo semelhante à exocitose.<sup>[15][16]</sup>

A degradação do osso começa com a ligação dos osteoclastos à matriz óssea (Figura 7), ao que se segue a formação de um meio extracelular entre ambos<sup>[17]</sup>, delimitado por uma zona de vedação (*sealing zone*), rica em filamentos de actina e desprovida de organelos. Esta estrutura possui a forma de anel e rodeia a membrana rugosa<sup>[18]</sup>, contendo podossomas da membrana plasmática osteoclástica<sup>[21]</sup>, onde se encontram proteínas como a vinculina, talina e  $\alpha$ -actinina, responsáveis pela ligação ao citosqueleto das células ósseas.<sup>[22]</sup> Tal como a membrana rugosa, o anel de podossomas aparece juntamente com o início da reabsorção óssea, e desaparece após o osteoclasto ser destacado da matriz óssea.<sup>[18]</sup>

O reconhecimento ósseo por parte dos osteoclastos é mediado por integrinas, principalmente a integrina  $\alpha v \beta 3$ . Este facto foi demonstrado em estudos, nos quais a expressão da mesma foi bloqueada, o que originou, por parte das respetivas células osteoclásticas, a não formação de anéis de actina, membranas rugosas anormais, e deficiente reabsorção óssea.<sup>[19]</sup> Desconhece-se, no entanto, se existe um reconhecimento de locais predeterminados no osso, ou se essa ação é estocástica.<sup>[20]</sup>



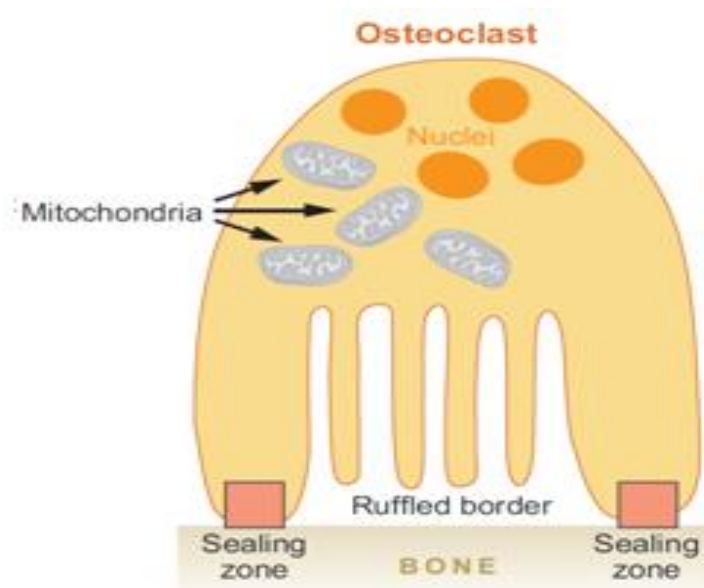


Figura 7 – Diagrama esquemático de um osteoclasto polarizado no osso. A membrana rugosa encontra-se rodeada pela zona de vedação, sendo a ligação à matriz óssea regulada pela integrina  $\alpha v \beta 3$ .<sup>[166]</sup>

A degradação da fase orgânica do osso é antecedida pela dissolução da sua fase inorgânica.<sup>[23]</sup> Os osteoclastos dissolvem a componente mineral óssea na lacuna de reabsorção, através de segregação ácida, realizada por intermédio de, pelo menos, duas entidades moleculares diferentes (Figura 8).<sup>[24][25]</sup> A primeira consiste numa bomba de prótons  $H^+$ , presente na membrana rugosa das células osteoclásticas<sup>[26][27][28]</sup>, e alimentada por ATP, sendo denominada ATPase vacuolar<sup>[26][29]</sup>, a segunda baseia-se no transporte de aniões  $Cl^-$ , através de canais iónicos específicos de cloreto (*chloride channel 7 - CIC-7*).<sup>[30]</sup> Da ação combinada destas duas moléculas, resulta a segregação de ácido clorídrico (HCl) no meio de reabsorção, o que causa uma diminuição do valor do pH para aproximadamente 4,5<sup>[17]</sup>, permitindo a solubilização dos sais alcalinos da hidroxiapatite.

A dissolução dos cristais de HA liberta grandes quantidades de cálcio e fosfato, que necessitam de ser transportadas para o exterior da lacuna de reabsorção, de modo a dar continuidade ao processo reabsortivo. É também gerado um grande volume de bicarbonato que, se não for removido, neutraliza o baixo pH existente, bloqueando a subsequente desmineralização. Este processo ainda não se encontra, no entanto, totalmente explicado<sup>[31]</sup>, existindo teorias que envolvem o transporte de moléculas em vesículas, o transporte de iões através de proteínas de ligação e, ainda, canais iónicos ou bombas na membrana plasmática.<sup>[14]</sup>

A dissolução dos minerais ósseos torna possível a atuação de enzimas proteolíticas, que degradam a matriz orgânica. Existem dois grupos de enzimas envolvidos neste processo: as metaloproteínases da matriz e as proteases lisossomais. Entre as últimas, destaca-se a catépsina K, expressa pelos osteoclastos e segregada na lacuna de reabsorção.<sup>[32][33]</sup> A função desta protease, quando em pH ácido, é clivar o colagénio tipo I.<sup>[34][35]</sup> Os produtos de degradação resultantes são endocitados pelas células osteoclásticas sendo, em seguida, transportados e libertados através da superfície oposta ao local de reabsorção.<sup>[36]</sup>

O papel das MMP, pelo contrário, não é totalmente conhecido. Os dados atuais sugerem que a degradação da matriz orgânica se inicia com estas enzimas, e continua através de proteases de cisteína, um processo regulado por estrogénio.<sup>[37]</sup> Assim, pensa-se que as MMP exerçam a sua função na reabsorção óssea através de, principalmente, outras células que não os osteoclastos.<sup>[38]</sup>

O processo reabsortivo é cíclico, começando com a aderência dos osteoclastos à matriz óssea, seguida pela sua separação e migração para um novo local de degradação.<sup>[18]</sup> Ao contrário dos mecanismos que dão origem à reabsorção, os sinais de finalização não são ainda totalmente conhecidos. Pensa-se que recetores na membrana plasmática reconheçam níveis elevados de cálcio no interior do espaço de reabsorção, o que leva à conclusão da ação do osteoclasto e à sua retirada. Há, ainda, indícios que apontam no sentido de efeitos inibidores da atividade osteoclástica, de agentes como o estrogénio, induzirem a apoptose destas células.<sup>[39][40]</sup>

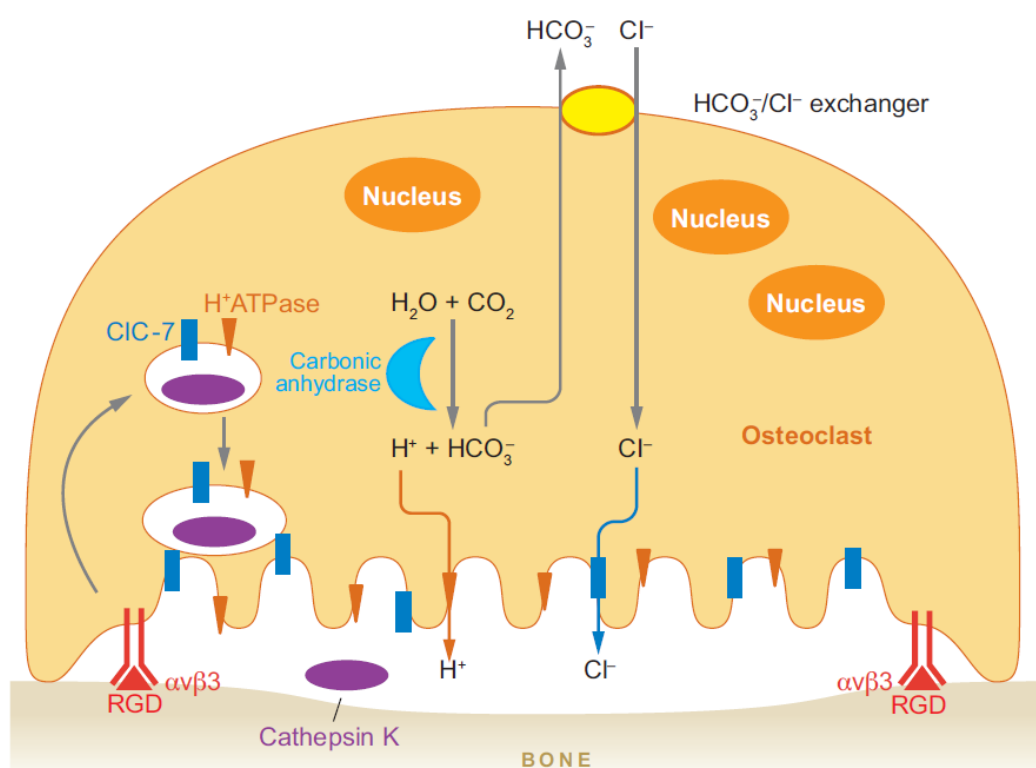


Figura 8 – Reabsorção osteoclástica: os iões  $H^+$  são transportados para a lacuna de reabsorção por uma bomba de prótons (ATPase vacuolar) localizada na membrana rugosa, formada por vesículas que transportam a bomba e que se integram na membrana. O pH celular é mantido através da troca iónica  $Cl^-/HCO_3^-$  na superfície não reabsorvente e a eletroneutralidade por canais de cloreto (CIC-7) que transportam  $Cl^-$  para a lacuna de reabsorção. A matriz orgânica é decomposta por uma protease, a cathepsina K.<sup>[166]</sup>

## Osteoclastogénese

A osteoclastogénese, ou seja, a maturação de precursores osteoclásticos em osteoclastos, é um processo extremamente complexo, dependente de várias comunicações entre diferentes tipos celulares. O seu principal mecanismo de ação necessita da presença de células do estroma da medula óssea ou de osteoblastos. Estas células expressam duas moléculas essenciais para promover a osteoclastogénese: o *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF) e o *receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand* (RANKL).<sup>[41]</sup>

O M-CSF liga-se ao seu recetor, c-Fms, presente nos precursores osteoclásticos, originando os sinais necessários à sobrevivência e proliferação dos mesmos.<sup>[41]</sup> O RANKL é um fator de diferenciação, localizado nas células do estroma, que se liga ao *receptor activator of nuclear factor kappa-B* (RANK), presente em osteoclastos e seus precursores, acionando diretamente a osteoclastogénese.<sup>[42]</sup> Assim, o RANKL estimula os precursores, previamente ativados com M-CSF, a desenvolverem o fenótipo osteoclástico. Esta dinâmica foi comprovada pela possibilidade de modulação do número de osteoclastos obtidos *in vitro*, através de variações da concentração de M-CSF e RANKL em culturas celulares.<sup>[43]</sup>

Para além das células do estroma da medula óssea e dos osteoblastos, existem ainda outras células responsáveis pela regulação da osteoclastogénese. Foi demonstrado, *in vitro*, que os linfócitos T promovem este processo, através da expressão de RANKL.<sup>[176]</sup> A resposta imune é essencial para a defesa do organismo, mas a sua ativação prolongada, decorrente de certas condições autoimunes, resulta, invariavelmente, na destruição do tecido ósseo. Na artrite reumatoide, a excessiva reabsorção osteoclástica causa graves danos ósseos, conduzindo a uma destruição progressiva das articulações. A expressão de RANKL, por parte dos linfócitos T, parece desempenhar um papel importante neste processo. Além do RANKL, outros fatores imunomoduladores, expressos por estas células, regulam a osteoclastogénese<sup>[177]</sup>, apesar de o respetivo mecanismo molecular permanecer desconhecido.<sup>[178]</sup>

É, também, atualmente aceite que expressão de RANKL, por fibroblastos sinoviais, induz o processo osteoclastogénico, estando o excesso destas células associado à artrite reumatoide.<sup>[179]</sup> No entanto, este conceito foi recentemente desafiado: foram isolados fibroblastos humanos, de pacientes com artrite reumatoide e outras doenças ósseas; em seguida, foram cultivadas, na sua presença, células mononucleares do sangue periférico humano. Aqui, foi verificado que, na presença de osteoprotegerina (OPG), um antagonista do RANKL e M-CSF, a formação de osteoclastos ocorreu de forma regular. Estes dados sugerem que os meios de fibroblastos contêm mediadores que induzem a osteoclastogénese em células mononucleares, independentemente do RANKL. Além disso, a inibição de algumas citocinas não foi suficiente para revogar os sinais provenientes dos fibroblastos sinoviais humanos, demonstrando que existem caminhos osteoclastogénicos alternativos, sendo o fibroblasto sinovial um regulador central neste processo.<sup>[180]</sup>

## Fatores que influenciam a osteoclastogénese

A expressão em excesso de osteoprotegerina inibe a osteoclastogénese, devido ao facto de esta proteína ser um recetor que compete com o RANK, pela ligação ao RANKL.<sup>[43]</sup> Em última análise, é a diferença entre a expressão de RANKL, estimulador da osteoclastogénese, e de OPG, inibidor da mesma, que dita a taxa de osso reabsorvido.<sup>[44]</sup>

Por outro lado, a hormona da paratiroide estimula a osteoclastogénese, pois interage com recetores osteoblásticos e células do estroma, que produzem o fator osteoclastogénico RANKL.<sup>[45]</sup> Outro exemplo é a forma biologicamente ativa da vitamina D<sub>3</sub>, que promove a expressão de RANKL pelas células do estroma e osteoblastos, induzindo a diferenciação dos precursores osteoclásticos.<sup>[46]</sup>

O RANKL e o RANK são proteínas pertencentes à família do *tumor necrosis factor* (TNF), e dos recetores de TNF, respetivamente. O TNF é uma citocina envolvida na inflamação sistémica, pelo que, geralmente, se observa uma resposta inflamatória em ossos que exibem grande proliferação osteoclástica. Apesar de ser um processo ainda não totalmente compreendido, sabe-se que o TNF estimula os osteoblastos a expressarem RANKL e M-CSF, o que promove a osteoclastogénese<sup>[47]</sup>, e que é possível modular positiva e negativamente este processo através de recetores de TNF específicos.<sup>[48]</sup>

Existem, no entanto, autores que defendem que a osteoclastogénese pode ocorrer através de um mecanismo independente do sistema RANKL–RANK, sendo o TNF responsável por estimular, na presença de M-CSF, a diferenciação de macrófagos em osteoclastos. Assim, demonstrou-se que a formação osteoclástica, induzida por TNF, foi inibida pela adição de anticorpos dos recetores de TNF, mas não pelo fator de inibição da osteoclastogénese, a OPG, que compete pela ligação com o RANKL, nem por anticorpos anti–RANK. Além disso, experiências com macrófagos de ratos, nos quais os recetores de TNF foram suprimidos, revelaram que os sinais induzidos pelos mesmos eram importantes para a formação osteoclástica.<sup>[170]</sup>

O NF-κB (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) é um fator de transcrição que regula a osteoclastogénese, assim como a função e sobrevivência dos osteoclastos. A deleção de algumas das suas subunidades provoca a ausência de osteoclastos, resultando em osteopetrose. Por conseguinte, o NF-κB é essencial para que precursores osteoclásticos, que expressam RANK, se diferenciem em osteoclastos, em resposta ao RANKL e outras citocinas osteoclastogénicas. Neste contexto, os inibidores de NF-κB previnem a formação osteoclástica induzida, direta ou indiretamente, por RANKL ou TNF.<sup>[171]</sup>

As proteínas MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) participam em respostas celulares a estímulos de ordem química, mecânica, térmica, e biológica, regulando a proliferação, expressão génica, diferenciação, mitose e apoptose celular, entre outras.<sup>[172]</sup> Estas proteínas intervêm na diferenciação osteoclástica, o que foi demonstrado através de um inibidor da MAPK p38, cuja ação bloqueou a osteoclastogénese induzida por RANKL, em culturas de células da medula óssea de ratos, sugerindo um efeito de inibição diretamente nos precursores osteoclásticos. No

entanto, o mesmo inibidor não produziu qualquer efeito na sobrevivência nem na atividade de reabsorção dos osteoclastos diferenciados, o que sugere que a função destas células é independente da sinalização mediada por p38 MAPK.<sup>[173]</sup>

A prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) é uma molécula lipídica, com uma importante função reguladora no osso, tendo-se verificado a sua responsabilidade no estímulo da osteoclastogénese e da atividade de reabsorção em culturas de células ósseas de ratos, presumivelmente através de osteoblastos.<sup>[174]</sup> Há, no entanto, autores que defendem que a PGE<sub>2</sub> inibe a osteoclastogénese em humanos. Assim, foram examinados os efeitos da PGE<sub>2</sub> na formação de osteoclastos humanos, em culturas de monócitos preparados a partir de células mononucleares do sangue periférico humano. Em contraste com as culturas de macrófagos de ratos, a PGE<sub>2</sub> inibiu a formação osteoclástica humana, induzida por RANKL e por PTH. Estes resultados sugerem que a PGE<sub>2</sub> inibe a osteoclastogénese em humanos, através da produção de um ou mais fatores inibidores da diferenciação dos precursores osteoclásticos.<sup>[175]</sup>

Também a interleucina-1 (IL-1) estimula a expressão de M-CSF pelas células do estroma, podendo este efeito ser inibido por estrogénio.<sup>[49]</sup> Esta é a razão pela qual existe, nas mulheres, uma maior propensão para a osteoporose após a menopausa.<sup>[47]</sup>

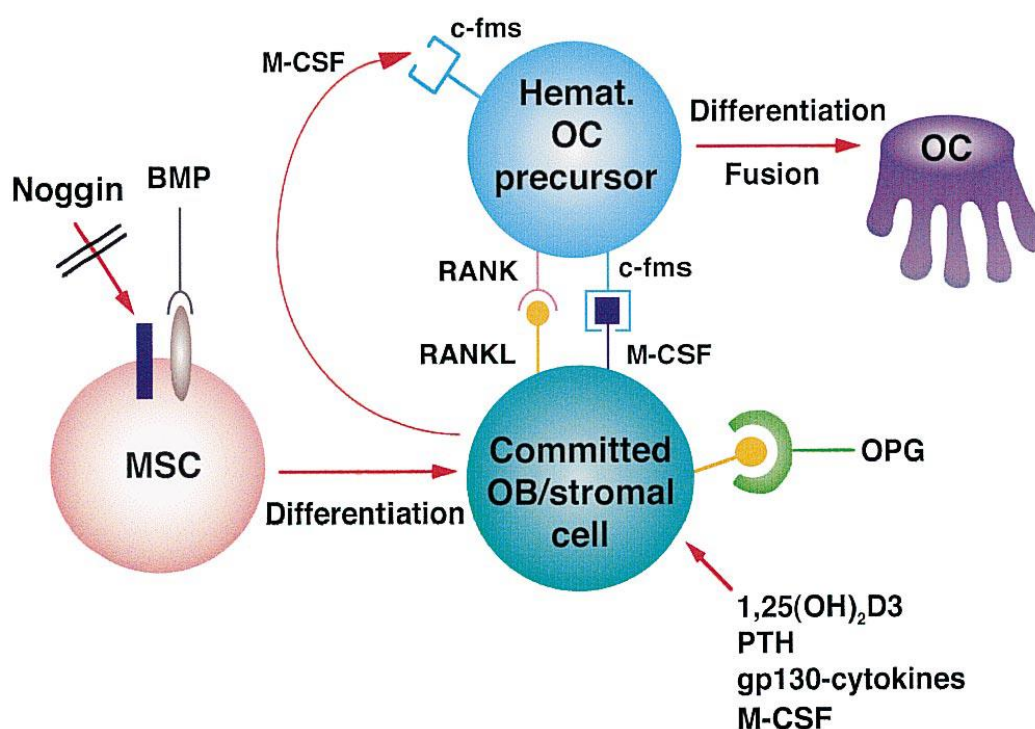


Figura 9 – Modelo das interações celulares da osteoclastogénese. As células estaminais mesenquimais (*mesenchymal stem cells* - MSC), progenitoras das células do estroma e osteoblastos, diferenciam-se após exposição às proteínas ósseas morfogenéticas (BMP). Esta interação pode ser bloqueada por proteínas como a Noggin. As células do estroma e os osteoblastos expressam RANKL na sua superfície, um processo que pode ser regulado pela vitamina D3, hormona da paratiroide (PTH), e citocinas, como a IL-6 e a oncostatina M. Em seguida, o RANKL interage com o seu recetor, o RANK, expresso na superfície dos precursores osteoclásticos, induzindo a diferenciação destas células na forma de osteoclastos maduros (OC). A osteoprotegerina (OPG) pode inibir a interação RANKL–RANK, ligando-se ao RANKL. O M-CSF, segregado pelas células do estroma e osteoblastos, interage com o seu recetor, o c-fms, de forma a suportar e aumentar a osteoclastogénese.<sup>[220]</sup>

## Biomateriais

As atuais técnicas de implante ósseo utilizam excertos autólogos ou alogénicos, apresentando um grande risco de fraturas, infeções, hematomas, seromas e dor crónica. De forma a criar substitutos sintéticos que ultrapassem as limitações deste tipo de enxerto, foram utilizados biomateriais, compostos por polímeros naturais e sintéticos, cerâmicas, metais e materiais compósitos.<sup>[52]</sup>

O objetivo, em contexto ósseo, dos enxertos sintéticos, é recriar as propriedades físicas e mecânicas do osso, e promover a osteocondução e regeneração óssea. Alguns destes são, ainda, capazes de libertar fármacos e fatores de crescimento, de forma a produzir um efeito mais rápido e eficaz, podendo esta libertação ser modulada temporalmente.<sup>[50]</sup>

São necessários vários processos para promover uma reconstrução óssea bem sucedida, entre os quais osteoprodução, osteoindução, osteocondução, estimulação mecânica e vascularização. Estes requisitos podem ser, dentro de determinados limites, estimulados, recorrendo a certos fármacos que atuam no metabolismo ósseo e promovem a formação de novo tecido.<sup>[51]</sup> Os enxertos autólogos apresentam algumas destas propriedades, pois são osteogénicos, osteocondutivos e osteoindutivos, não exibem imunogenicidade, nem transmitem doenças. No entanto, a sua disponibilidade é bastante limitada, a qualidade é variável, e podem originar hematomas, infeções, hemorragias e dores crónicas, apresentando ainda um custo mais elevado.<sup>[52][53]</sup>

Por estes motivos, existe um crescente interesse na utilização de biomateriais, como substitutos ósseos, de forma a recriar as características tridimensionais dos tecidos autólogos, permitindo, ao mesmo tempo, uma proliferação celular adequada.<sup>[54]</sup>

## Requisitos

De forma a não comprometer a finalidade da sua utilização, os biomateriais devem corresponder a vários critérios<sup>[50]</sup>, entre os quais se destacam:

- a capacidade da sua superfície promover a adesão e crescimento celular, permitindo a manutenção das funções celulares;
- a biocompatibilidade, ou seja, a não promoção de uma resposta imunológica, inflamatória ou tóxica *in vivo*, quer pelo material utilizado, quer pelos seus produtos de degradação;
- a biodegradabilidade, para que, de acordo com a sua utilização, os biomateriais possam ser, gradualmente, substituídos por tecido natural;
- a porosidade adequada à adesão celular e à regeneração da matriz extracelular, permitindo uma distribuição celular equilibrada e homogénea ao longo do biomaterial;
- a reprodutibilidade, de modo que a sua estrutura tridimensional não seja sujeita a variações;
- uma estrutura e propriedades mecânicas semelhantes às do tecido a reparar.

## **Tipos de biomateriais**

Existem duas categorias de biomateriais usados como implantes ósseos<sup>[55]</sup>:

- Biomateriais naturais;

Estes biomateriais são derivados de tecidos vivos, como por exemplo, o osso trabecular, ou a matriz óssea desmineralizada. A desmineralização da matriz é efetuada através da extração, por ácido, dos minerais, permanecendo os seus principais constituintes, ou seja, colagénio tipo I e proteínas que estimulam a formação óssea.<sup>[56]</sup> Estes implantes possuem boa biocompatibilidade e biorreabsorção, mas podem ser imunogénicos e transmitir doenças.<sup>[57]</sup>

- Biomateriais sintéticos;

São formados a partir de uma grande variedade de materiais, como polímeros naturais ou sintéticos, cerâmicas, metais e materiais compósitos, com o objetivo de recriar as características tridimensionais dos tecidos autólogos, permitindo uma proliferação e função celular adequada.<sup>[58]</sup>

Estes biomateriais são matrizes que fornecem um ambiente e arquitetura apropriados ao desenvolvimento dos tecidos. Podem ser usados como meio de transporte para libertação de fármacos, tais como antibióticos ou fatores de crescimento<sup>[59][60]</sup>, existindo vários tipos, dependendo do propósito da aplicação (estrutural ou terapêutica).

### **Polímeros**

Os polímeros podem ser divididos em naturais ou sintéticos. O colagénio tipo I, a fibrina, o ácido hialurónico, e o quitosano são polímeros naturais biodegradáveis, com boa biocompatibilidade e osteocondutividade, apresentando, no entanto, baixa estabilidade mecânica.<sup>[61]</sup> Os polímeros sintéticos biodegradáveis, como o polipropileno, a policaprolactona, e o ácido polilático, entre outros, são utilizados em várias aplicações, pois apresentam diversas propriedades de interesse, de acordo com a sua finalidade, tais como diferentes propriedades físicas e mecânicas, e tempos e modos de degradação variáveis.<sup>[62][63]</sup>

### **Cerâmicas**

As cerâmicas são compostas por materiais inorgânicos e não metálicos, apresentando uma estrutura cristalina. Possuem uma grande resistência à compressão e baixa ductibilidade, ou seja, suportam a deformação mas tendem a quebrar.<sup>[64]</sup>

O fosfato de cálcio é um exemplo de uma cerâmica usada como matriz para regeneração óssea, pois a componente inorgânica do osso é formada por um material

semelhante, a hidroxiapatite. Além disso, este material estimula a formação, precipitação e deposição de cálcio, resultando numa maior resistência matricial. As cerâmicas possuem, também, um grande potencial como veículos de liberação de fármacos, devido à sua grande afinidade com proteínas.<sup>[65][66]</sup>

## **Metálicos**

Os biomateriais metálicos são, essencialmente, compostos por metais porosos, como o titânio, cuja estrutura consiste em poros interconectados, à semelhança do osso trabecular. O titânio é um metal biocompatível, resistente à corrosão, não biodegradável e possui um módulo de elasticidade variável, podendo ser fabricado em várias formas e texturas.

Estes biomateriais são principalmente usados para revestir a superfície de implantes, promover o crescimento ósseo e conferir estabilidade.<sup>[67]</sup> No entanto, tendem a formar uma superfície oxidada bioinerte, que não interage de forma perfeita com os tecidos envolventes, além de possuírem uma rigidez característica, que pode causar problemas no interface biomaterial-tecido.<sup>[68]</sup>

## **Compósitos**

Os materiais compósitos são uma combinação de materiais com diferentes características, exibindo, por essa razão, propriedades otimizadas. Um exemplo é a combinação de titânio com HA, que permite reduzir o caráter inerte do metal e aumentar a sua osteointegração.<sup>[50]</sup>

Também a combinação de cerâmicas bioativas (fosfato de cálcio) com polímeros favorece as características mecânicas do compósito final, pois a adição de polímeros a cerâmicas reduz a fragilidade das mesmas, ou seja, a sua tendência para quebrar. Por outro lado, aumenta a sua bioatividade e capacidade de liberação de agentes terapêuticos.



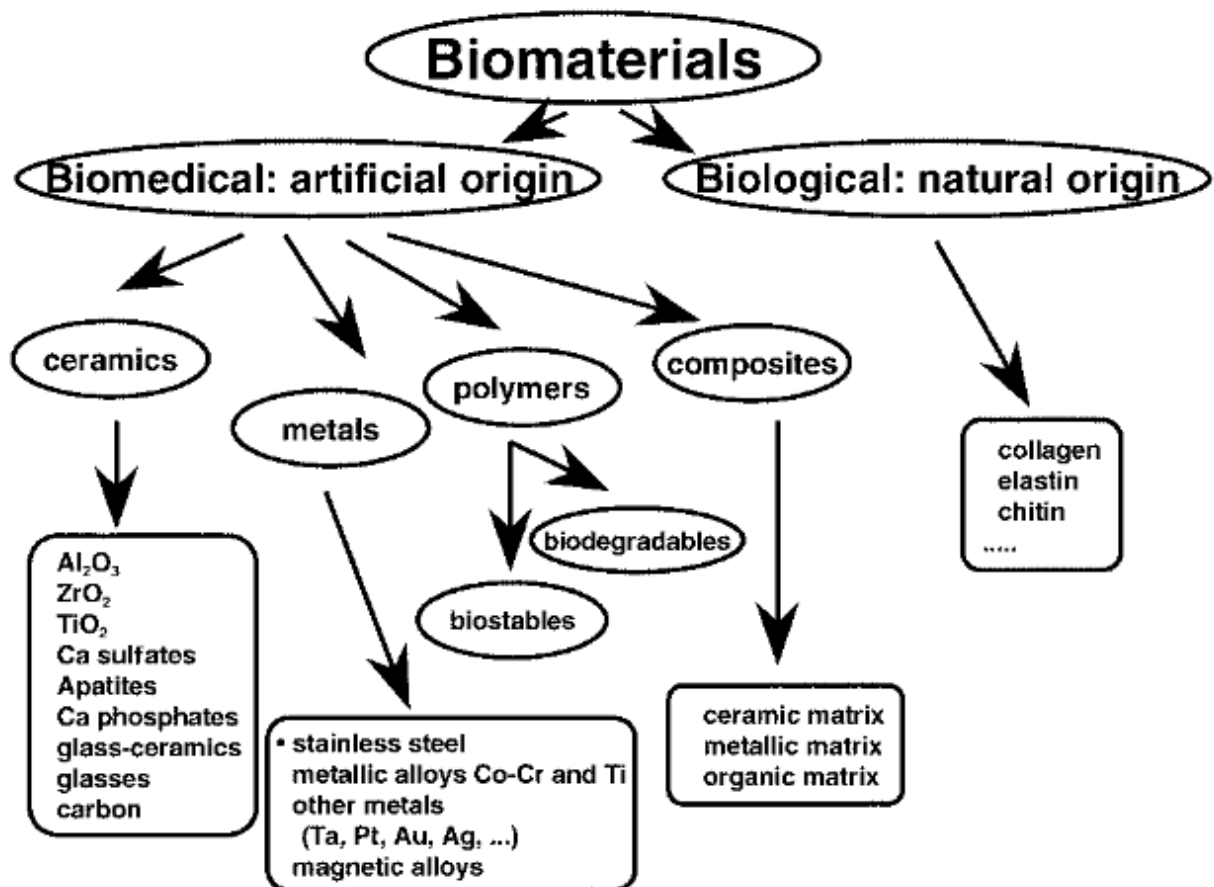


Figura 10 – Classificação e tipos de biomateriais.<sup>[84]</sup>

## Osteointegração

A osteointegração foi, originalmente, definida como uma ligação estrutural e funcional entre o tecido ósseo e a superfície do implante (Figura 11).<sup>[69]</sup> Histologicamente, define-se como “a fixação direta de um implante, pela formação de tecido ósseo em seu redor, sem que haja o crescimento de tecido fibroso na interface implante-osso”.<sup>[70]</sup> Devido às limitações da definição histológica, nomeadamente a falta de aplicabilidade clínica, foi proposta uma definição mais orientada no contexto biomecânico, segundo a qual a osteointegração “é um processo no qual é conseguida e mantida a fixação, clinicamente assintomática, do implante, podendo este ser, previsivelmente, incorporado com segurança no tecido ósseo, persistindo a fixação sob condições normais de carga”.<sup>[71][72]</sup> A osteointegração não acontece isoladamente, dependendo da existência dos processos de osteoindução e osteocondução. Além disso, o seu sucesso implica que a fixação ao osso se mantenha ao longo do tempo.<sup>[73]</sup>

Os implantes osteointegrados e funcionais demonstram uma interface com densidade óssea semelhante à do osso implantado.<sup>[74]</sup> No entanto, a obtenção desta condição é, geralmente, demorada, podendo ser acelerada através do revestimento do implante com HA.<sup>[75][76][77]</sup> Em geral, o sucesso da osteointegração depende, maioritariamente, da otimização do biomaterial, e não tanto de um aumento da taxa de resposta óssea.<sup>[73]</sup>

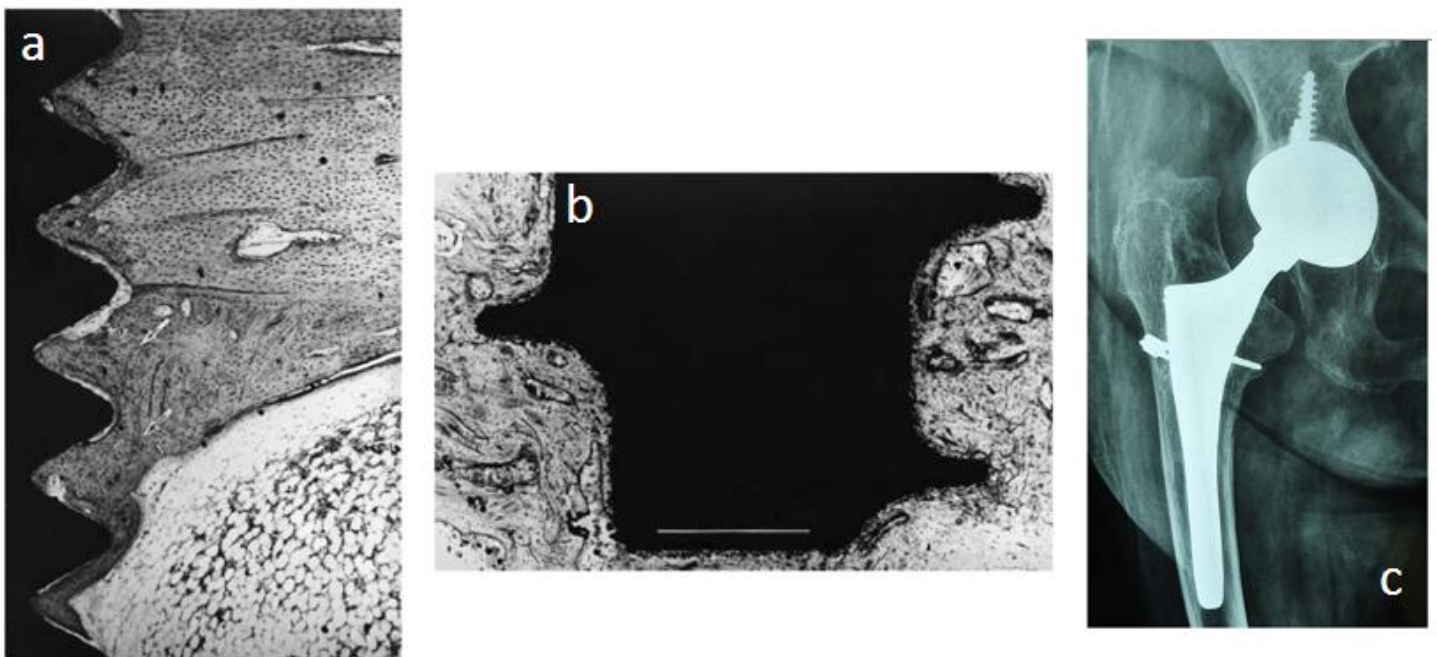


Figura 11 – a) Parafuso de titânio osteointegrado; b) parafuso vertebral revestido com HA<sup>[73]</sup>; c) Osteointegração de um implante da anca.<sup>[167]</sup>

## Hidroxiapatite

A hidroxiapatite -  $\text{Ca}_{10}(\text{OH})_2(\text{PO}_4)_6$  - é um fosfato de cálcio com uma composição química semelhante à componente inorgânica da matriz óssea. Por essa razão, existe, atualmente, um grande interesse em sintetizar HA como substituto ósseo em aplicações biomédicas.<sup>[78][79]</sup>

Os materiais à base de fosfato de cálcio possuem várias aplicações clínicas, nomeadamente do foro ortopédico, sendo principalmente utilizados na substituição de enxertos autólogos e em implantes metálicos.<sup>[80]</sup> Neste contexto, a HA apresenta as vantagens de ser biocompatível, devido à semelhança estrutural com o tecido ósseo<sup>[81]</sup>, bioativa, osteoindutiva e osteocondutora<sup>[82][83]</sup>, biodegradável, sendo lentamente substituída por tecido ósseo normal e, ainda, um material não carcinogénico nem alergénico. Também não apresenta toxicidade, nem induz uma resposta inflamatória/imunológica ou formação fibrosa.<sup>[84]</sup> Além disso, devido ao facto de constituir cerca de 70% da massa óssea<sup>[87]</sup>, a HA apresenta uma grande capacidade de absorção e adsorção de moléculas<sup>[88]</sup> (Figura 12). As suas principais aplicações são o preenchimento de defeitos ósseos e o revestimento de implantes metálicos.<sup>[85][86]</sup>

Apesar destas vantagens, possui fracas propriedades mecânicas, nomeadamente a resistência à fratura, o que restringe a sua aplicabilidade.<sup>[89]</sup> Por esta razão, a HA é usada como revestimento de próteses metálicas, combinando assim as características físicas dos metais com a sua biocompatibilidade e bioatividade.<sup>[84]</sup> Outra desvantagem é o facto de a sua semelhança com a componente mineral óssea resultar numa baixa taxa de biodegradação no interior do organismo<sup>[90][91]</sup>. Apesar de esta taxa aumentar com a porosidade<sup>[91]</sup>, a HA possui uma reduzida reatividade, sendo a substituição por tecido ósseo efetuada lentamente, o que faz com que permaneça no corpo por largos períodos de tempo<sup>[92][93]</sup>, uma situação normalmente indesejada.<sup>[94][95]</sup>

A hidroxiapatite pode ser sintetizada a altas temperaturas, exibindo uma elevada cristalinidade (cristais grandes), ou a baixas temperaturas, com cristalinidade reduzida (cristais pequenos), sendo possível, com esta segunda opção, sintetizar HA com propriedades semelhantes às do osso humano.<sup>[96]</sup> Existe também a possibilidade de modelar a estrutura da HA, através da substituição do cálcio por metais<sup>[97]</sup>, permitindo alterar a sua cristalinidade, textura e solubilidade.<sup>[88]</sup>

Nos últimos anos, houveram ainda várias tentativas de recombinar HA com outras cerâmicas<sup>[98]</sup>, polímeros<sup>[99]</sup> e, principalmente, vidros bioativos, que são muito mais reativos, de modo a obter materiais compósitos com propriedades biológicas melhoradas, na procura do desenvolvimento de uma nova geração de materiais com propriedades biológicas e mecânicas mais adaptadas.<sup>[100]</sup>

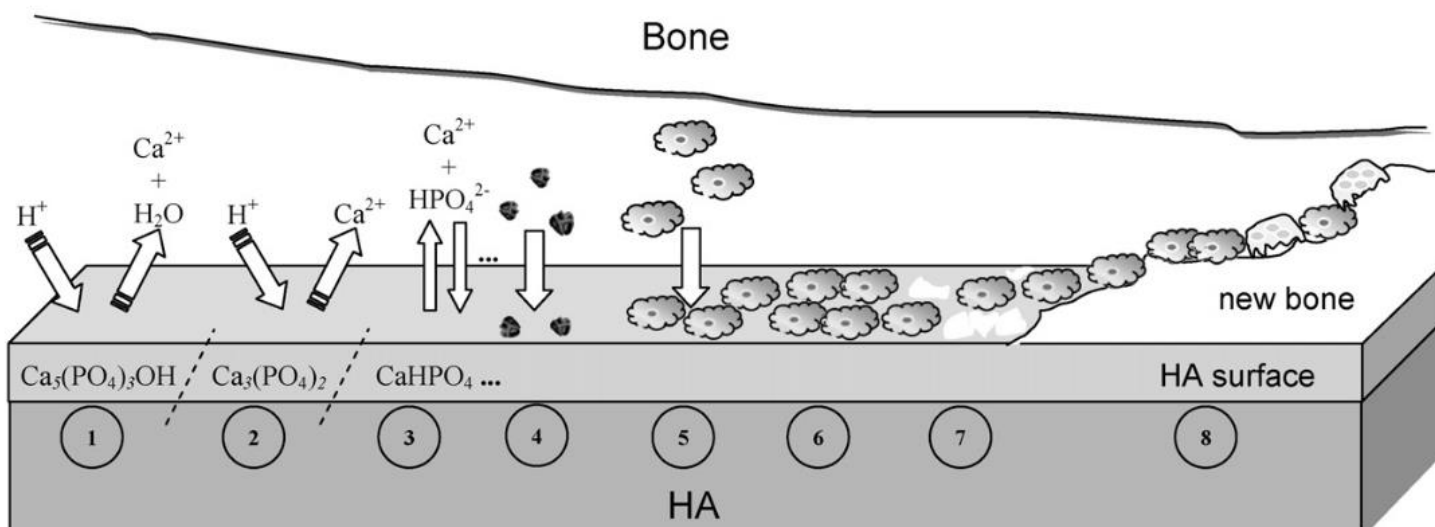


Figura 12 – Diagrama esquemático representativo dos fenômenos que ocorrem na superfície da HA após implantação. (1 e 2) Solubilização da superfície da HA. (3) Equilíbrio entre a solução fisiológica e a superfície da HA. (4) Adsorção de proteínas e material orgânico. (5 e 6) Adesão e proliferação celular. (7) Início de formação óssea. (8) Novo tecido ósseo formado.<sup>[168]</sup>

### Obtenção e caracterização da Hidroxiapatite

É possível obter HA pela técnica de precipitação, que acontece através da reação, a baixa temperatura, entre precursores de cálcio e fósforo. Daqui resulta um pó, que é calcinado, de modo a obter uma estrutura de apatite homogênea. A solução inicial é bastante diluída, sendo a precipitação e titulação executadas lentamente, o que leva a uma maior uniformidade da HA resultante. Além disso, o pH e a temperatura são cuidadosamente controlados.<sup>[101]</sup>

Após a obtenção da HA sintética, procede-se à sua caracterização, através de técnicas que permitem verificar a respetiva homogeneidade, presença e tamanho de poros favoráveis à osteointegração, e qualidade geral. Estas incluem a difração de raios-X (DRX), a espectroscopia por infravermelhos com transformada de Fourier (FTIR – *Fourier transform infrared spectroscopy*), e a microscopia eletrónica de varrimento (MEV).<sup>[102]</sup>

## Aplicações

Existem, atualmente, várias aplicações biomédicas para a HA (Tabela 1) como, por exemplo, a sua utilização enquanto revestimento de próteses metálicas, de modo a estabilizar a interface entre o implante e os tecidos.<sup>[96][103]</sup> A sua capacidade de libertação prolongada de fármacos permite o tratamento de doenças ósseas, nomeadamente do foro oncológico<sup>[96]</sup>, o que constitui uma enorme vantagem pois, deste modo, torna-se possível combinar o tratamento de tumores no tecido ósseo com a formação do mesmo.<sup>[104]</sup> No campo odontológico, utiliza-se HA na prevenção de perda óssea após extração de um ou mais elementos dentários<sup>[88]</sup>, em correções maxilo-faciais, implantes dentários, e no preenchimento de cavidades císticas, entre outras.<sup>[105]</sup>

As características da HA podem ser melhoradas, recorrendo à mistura com elastina<sup>[107]</sup>, quitosano<sup>[108]</sup>, e colagénio<sup>[109]</sup>, entre outros. Isto deve-se ao facto de estas moléculas promoverem a biocompatibilidade e incorporação do implante nos tecidos. Além disso, melhoram as suas propriedades mecânicas, pois aumentam a resistência e elasticidade.<sup>[110][111]</sup>

Tabela 1 – Aplicações da hidroxiapatite.<sup>[106]</sup>

Aplicações	Formas
Matriz ou suporte para crescimento ósseo	Grãos, porosa
Osso artificial	Grãos, densa, porosa
Cimento ósseo	Pó
Articulações artificiais	Metal revestido com HA
Próteses vasculares	Densa
Próteses traqueais	Porosa/Densa
Terminais percutâneos	Densa
Sistema de libertação	Densa/Pó

## Hidroxiapatite Nanoestruturada

É importante, na fase de desenvolvimento de implantes ósseos, ter em conta a interação dos mesmos com o osso, sendo desejável a utilização de biomateriais que formem tecido ósseo à sua superfície. As biocerâmicas compostas por hidroxiapatite microestruturada dissolvem-se lentamente, formando uma camada de apatite antes de interagirem com o tecido ósseo a nível atômico, o que não confere a estabilidade desejada. Além disso, não permitem um aporte sanguíneo totalmente adequado às necessidades de reparação dos tecidos, nem uma resposta completamente ajustada a variações de fatores externos, tais como a tensão mecânica.<sup>[112]</sup>

A estrutura porosa da HA, a uma escala nanométrica, constitui um ótimo substituto ósseo, devido à sua biocompatibilidade, bioafinidade e osteocondução (Figura 13).<sup>[121]</sup> Estas características não são obtidas com a mesma eficácia na HA microestruturada, pois a taxa de substituição do implante por tecido ósseo é muito inferior.<sup>[113]</sup> Além disso, a microHA apresenta uma distribuição não uniforme dos poros, e baixa ligação entre os mesmos, o que dificulta o seu preenchimento.<sup>[114]</sup> Por outro lado, as cerâmicas baseadas em nanoHA exibem estruturas altamente interligadas, permitindo uma osteocondução mais eficaz<sup>[113]</sup>, sendo o tamanho e densidade dos poros, assim como as interligações entre si, fatores importantes neste processo.<sup>[115][116]</sup>

Os cristais de apatite presentes no corpo humano (esmalte, dentina e cimento) são materiais nanoestruturados.<sup>[117]</sup> Por conseguinte, a nanoHA representa a forma com maior potencial de estudo e aplicação biomédica.<sup>[118]</sup> Além disso, as interações moleculares são efetuadas à escala nanométrica, pelo que a utilização de um material na mesma proporção as torna mais rápidas e eficazes. Estudos efetuados em defeitos ósseos, implantados com HA micro e nanoestruturada, revelaram um crescimento bastante mais significativo nas áreas implantadas com nanoHA, o que revela o potencial da mesma neste tipo de aplicações.<sup>[122]</sup>

As características estruturais dos biomateriais, como a área de superfície, o volume dos poros, ou o tamanho das partículas, podem influenciar a sua resposta no meio fisiológico. Assim, a nanoHA possui propriedades que permitem um melhor controlo das interações proteicas (adsorção, conformação e bioatividade), sendo possível dirigir as respostas celulares (adesão e proliferação), ou a síntese e deposição de minerais.<sup>[119]</sup>

A HA nanocristalina possui, ainda, uma melhor sinterabilidade e densificação, resultantes da sua maior área de superfície, sendo os materiais sintetizados mais resistentes a fraturas.<sup>[120]</sup> Os métodos utilizados para a sua preparação incluem a precipitação química<sup>[123][124]</sup>, o tratamento hidrotérmico<sup>[124][125]</sup>, pectização (sol-gel)<sup>[126][127]</sup>, microemulsão<sup>[128][129]</sup>, síntese mecânico-química<sup>[130][131]</sup> e eletrodeposição.<sup>[132]</sup>

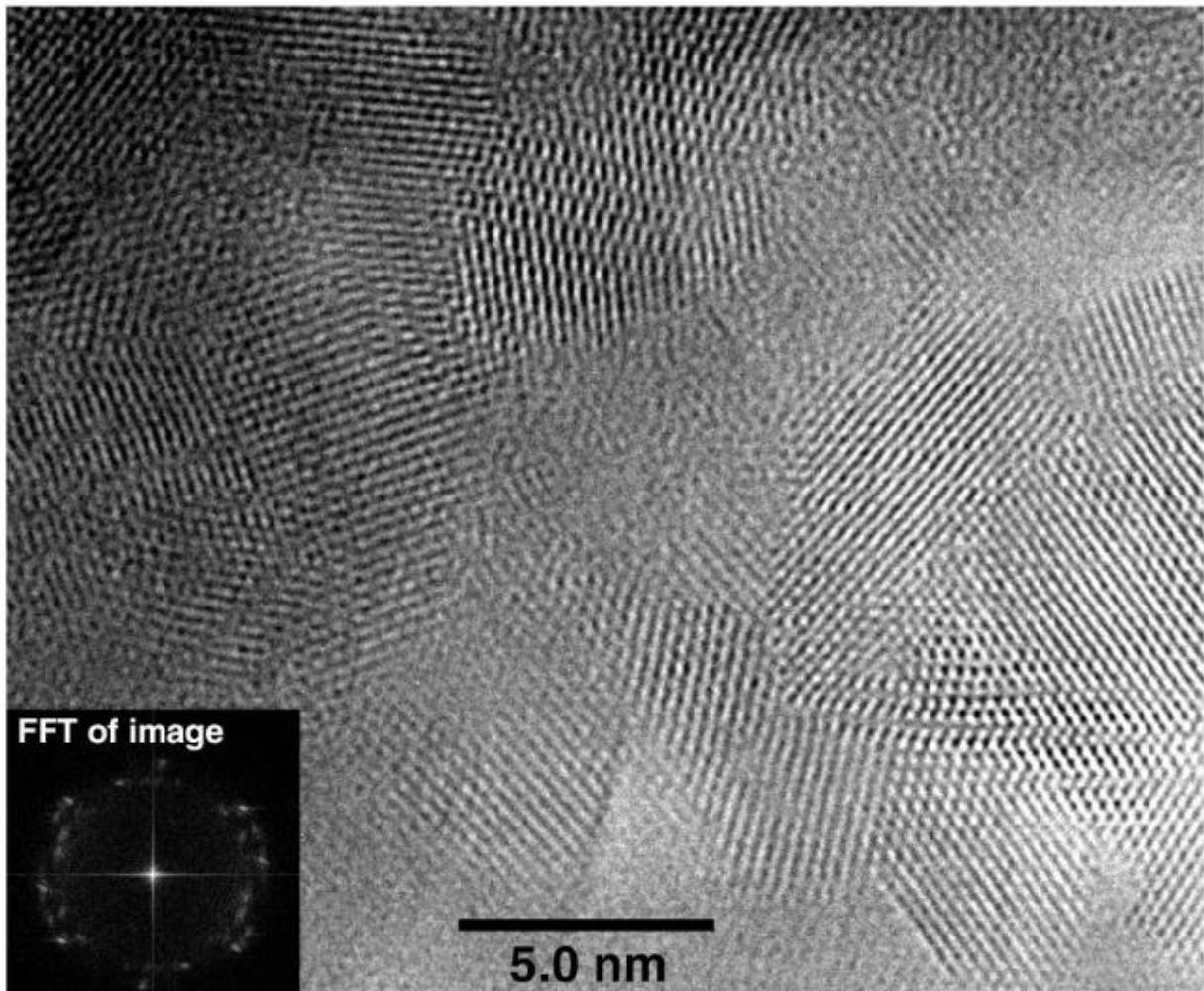


Figura 13 – Imagem de alta resolução de HA nanoestruturada.<sup>[118]</sup>

## Inibidores da bomba de prótons

O ácido gástrico é segregado pelas células parietais do estômago, em resposta a estímulos provocados pela presença de alimentos. Este processo inicia-se com a ativação de recetores localizados nas células parietais, que enviam sinais à adenosina trifosfatase hidrogénio-potássio (ATPase  $H^+/K^+$ ), ou bomba de prótons, resultando na segregação ácida.<sup>[156]</sup>

Quando ativada, a bomba de prótons gástrica bombeia iões  $H^+$  em troca de iões  $K^+$ .<sup>[135][136]</sup> Deste modo, a forma mais eficaz de travar este processo é através do bloqueio do seu principal responsável, a ATPase  $H^+/K^+$ . Para tal, são utilizados antagonistas desta bomba, que a bloqueiam através da ligação competitiva ao  $K^+$  (Figura 14).<sup>[137]</sup>

Atualmente, os inibidores da bomba de prótons (IBP) são principalmente utilizados na diminuição da referida segregação de ácido gástrico, pois a sua ação bloqueia a bomba responsável pela mesma.<sup>[134]</sup> Assim, são aplicados no tratamento do refluxo gástrico e gastrite, bem como de úlceras estomacais e duodenais.<sup>[133]</sup> O efeito produzido por estes fármacos é independente do estímulo inicial, contrariamente à inibição provocada por outro tipo de moléculas, como os antagonistas de recetores de histamina, por exemplo.<sup>[156]</sup>

Os IBP são bases fracas, pelo que são capazes de atravessar as membranas das células parietais, cujo interior consiste num meio extremamente ácido, acumulando-se nos canalículos secretores das mesmas.<sup>[134]</sup> Aqui, sofrem um rearranjo químico, transformando-se na sua forma ativa, a qual inibe a atividade da bomba de prótons.<sup>[138][139]</sup>

Pensa-se que as terapias baseadas em IBP estejam, a longo prazo, relacionadas com um risco aumentado de fratura óssea. A solubilidade do cálcio é um fator importante para a sua absorção<sup>[140]</sup>, e um meio ácido facilita a assimilação deste mineral.<sup>[141]</sup> Por conseguinte, a má absorção de cálcio, decorrente da inibição de ácido no lúmen gastrointestinal, pode explicar esta situação. Verificou-se, em estudos com ratos, que tratamentos com IBP originaram uma má absorção de fosfato de cálcio, assim como uma diminuição da densidade mineral óssea. Após uma redução do pH gastrointestinal, ambas foram novamente normalizadas<sup>[142][143]</sup>, o que sugere que o ácido gástrico desempenha um papel importante na absorção de cálcio.<sup>[144]</sup>

Alguns estudos, ainda, examinaram o efeito de terapias com base em IBP na absorção de cálcio em humanos: entre indivíduos jovens e saudáveis, não foi causada uma redução significativa<sup>[145]</sup>; no entanto, com uma população acima dos 65 anos, foi verificado um impacto considerável.<sup>[146]</sup> Esta situação pode ter que ver com o facto de a população mais envelhecida apresentar uma grande taxa de gastrite que, em conjunto com terapias de inibição da segregação ácida, faz decrescer, de uma forma muito mais expressiva, a assimilação deste mineral.<sup>[144]</sup>



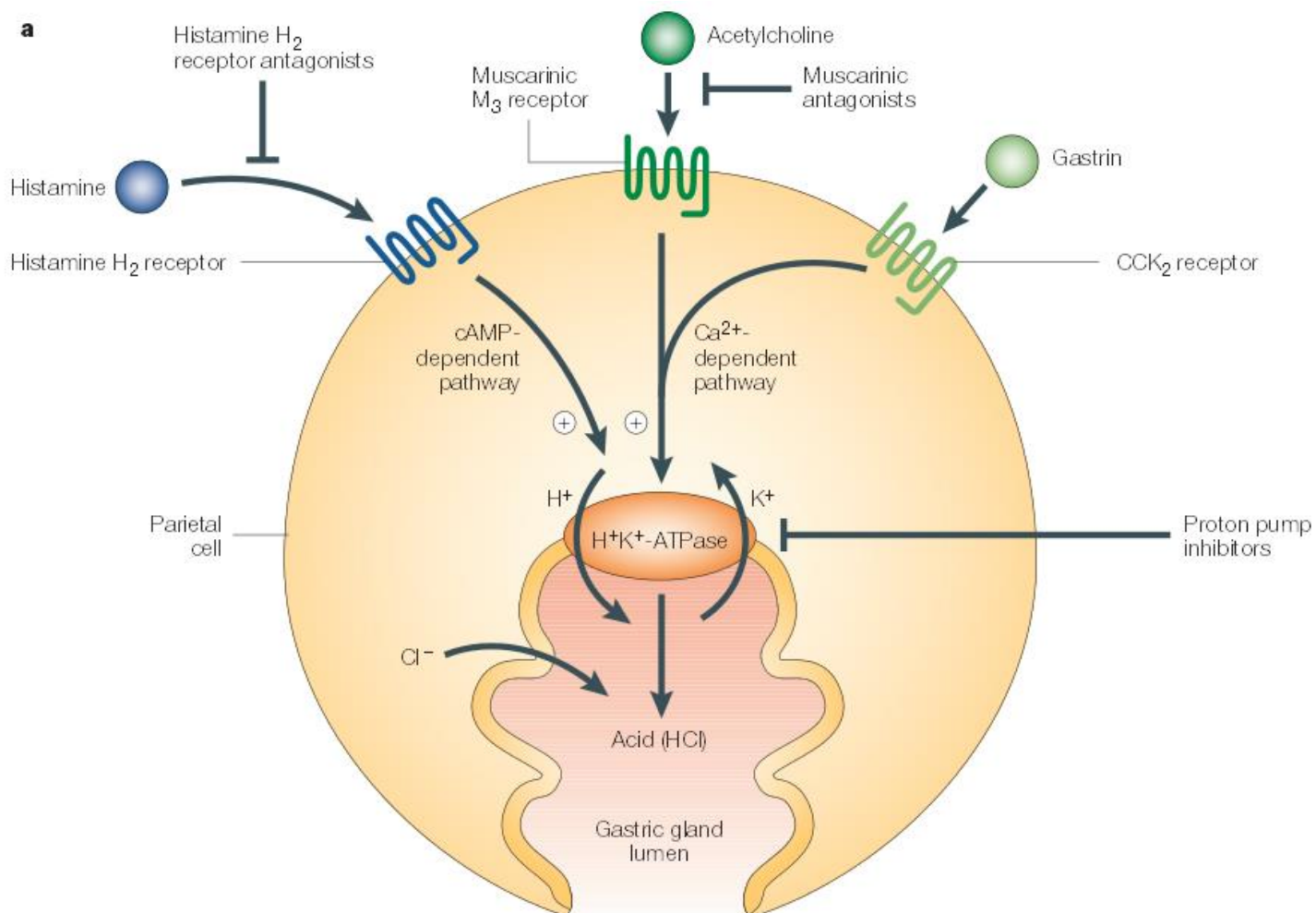


Figura 14 – Inibição da bomba de prótons gástrica através da ligação competitiva ao potássio.<sup>[156]</sup>

## Omeprazol

O omeprazol foi o primeiro IBP desenvolvido em grande escala, sendo ainda um dos mais utilizados. A sua conceção começou em 1973, quando foi descoberto um composto com uma grande capacidade de bloqueio da segregação ácida, o benzimidazol.<sup>[147]</sup> Este fármaco apresentava, no entanto, alguns problemas de toxicidade, pelo que foi sujeito a alterações na sua estrutura, de modo a preservar o seu efeito<sup>[148][149]</sup>, sem causar qualquer resultado prejudicial ao organismo.<sup>[150]</sup>

Sendo uma base fraca, o benzimidazol tem a capacidade de se acumular no compartimento ácido das células parietais, junto à bomba de protões. De forma a maximizar esta aglomeração, foi estruturalmente modificado, de modo a obter uma constante de acidez mais elevada, o que originou o omeprazol. Esta modificação também permitiu aumentar a taxa de conversão do omeprazol na sua forma funcional, pois esta é mediada por ácido.<sup>[150]</sup>

A grande capacidade de inibição da segregação ácida demonstrada pelo omeprazol advém da sua lipofilicidade, que permite a penetração na membrana celular, do facto de ser uma base fraca, concentrando-se em compartimentos ácidos, e da sua instabilidade em meio ácido, que significa que o produto da sua decomposição, o inibidor efetivo da segregação de ácido, é facilmente obtido. Apesar de o seu tempo de meia-vida no plasma ser curto (1 a 2 horas), o do complexo inibitório é longo (cerca de 24 horas).<sup>[153]</sup> Além disso, o omeprazol apresenta baixa toxicidade.<sup>[151][152]</sup>

### Mecanismo de ação

A ação de inibição do omeprazol acontece através do bloqueio específico da ATPase  $H^+/K^+$ , uma bomba de protões localizada nas membranas secretoras das células parietais da mucosa gástrica. Esta inibição tem a vantagem de ser independente do processo que originou a segregação, ao contrário de outros mecanismos utilizados anteriormente.<sup>[154][155]</sup>

Para que este processo ocorra é, no entanto, necessário que o omeprazol sofra uma transformação estrutural, pois a sua forma inicial não possui as mesmas faculdades (Figura 15). Assim, a ATPase  $H^+/K^+$  é bloqueada apenas após o contacto entre este IBP e o meio ácido, que gera a sua decomposição, formando um composto intermédio, o inibidor ativo da bomba de protões.<sup>[154][156]</sup>

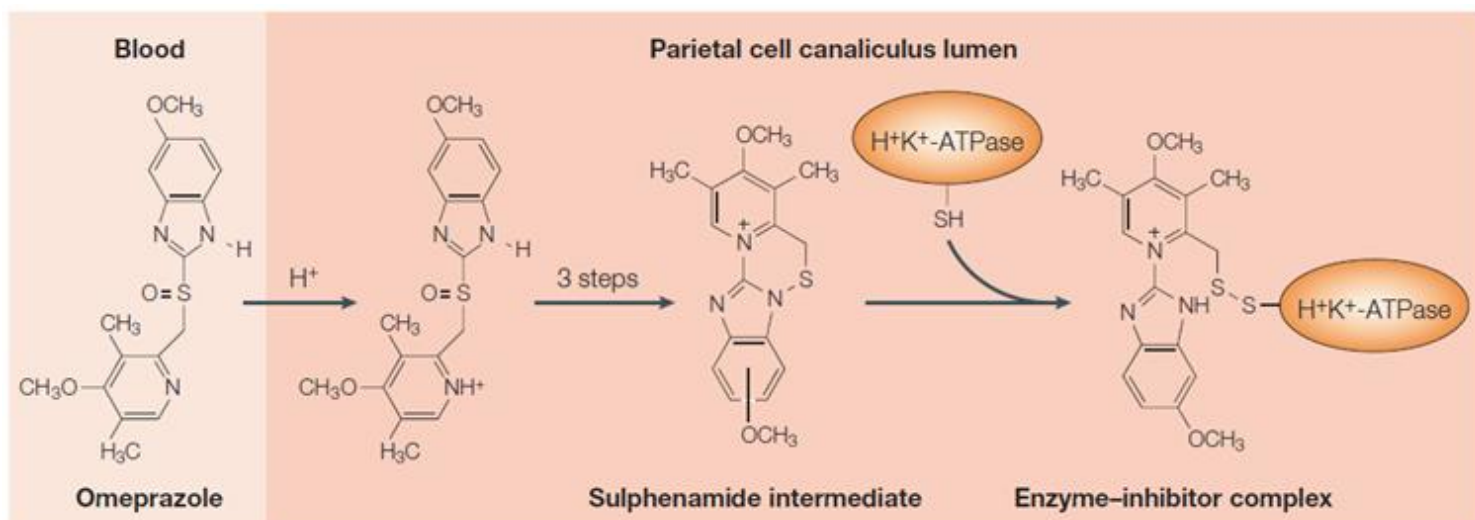


Figura 15 - O omeprazol é convertido na sua forma ativa em meios ácidos. Devido ao facto de ser uma base fraca, concentra-se especificamente nos canalículos secretores de ácido das células parietais, onde é ativado por um processo catalisado por protões, originando sulfenamida. Esta interage covalentemente com o grupo sulfidril dos resíduos de cisteína no meio extracelular da ATPase H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>, inibindo a sua atividade.<sup>[156]</sup>

## Bomba de prótons osteoclástica (ATPase Vacuolar)

A reabsorção osteoclástica acontece em quatro fases: migração, vínculo, degradação e remoção da superfície óssea. Este processo inicia-se com a formação da zona de vedação, que isola a lacuna de reabsorção<sup>[157]</sup>, assim como a membrana rugosa, justaposta à superfície do osso, através da qual é libertada uma mistura de enzimas, iões de hidrogénio ( $H^+$ ) e iões cloreto ( $Cl^-$ ).<sup>[158]</sup> A acidificação das lacunas de reabsorção é atingida através de uma bomba de prótons, à semelhança do que acontece no lúmen gástrico. Esta bomba exhibe, contudo, um mecanismo de ação diferente que, combinado com um antiportador de iões cloreto ( $Cl^-$ ), perfaz um sistema denominado ATPase vacuolar.<sup>[159][160]</sup>

Assim, a bomba de prótons osteoclástica utiliza ATP para expelir prótons  $H^+$  na lacuna de reabsorção, sendo o pH intracelular mantido através da exportação de iões  $Cl^-$  para a mesma, através de canais presentes na membrana rugosa.<sup>[158]</sup> A segregação de  $H^+$  e  $Cl^-$  dissolve a componente mineral do osso, e os produtos de degradação sofrem endocitose, sendo transportados e libertados no meio extracelular.<sup>[161]</sup>

## Estrutura

A ATPase vacuolar é um complexo macromolecular localizado na membrana rugosa dos osteoclastos ativos, responsável por regular a acidificação extracelular necessária para a desmineralização óssea. Esta enzima desempenha um papel importante em doenças relacionadas com a atividade osteoclástica, tais como a osteopetrose e osteoporose.<sup>[159]</sup>

É composta por 14 subunidades, organizadas em dois domínios estrutural e funcionalmente distintos. O primeiro, localizado na periferia da célula, executa a hidrólise de ATP (V1), e o segundo, situado na membrana rugosa, é responsável pelo transporte de prótons (V0) (Figura 16). A hidrólise de ATP que ocorre no domínio V1 causa a rotação do complexo, permitindo a passagem de prótons  $H^+$  por canais presentes no domínio V0.<sup>[158]</sup>

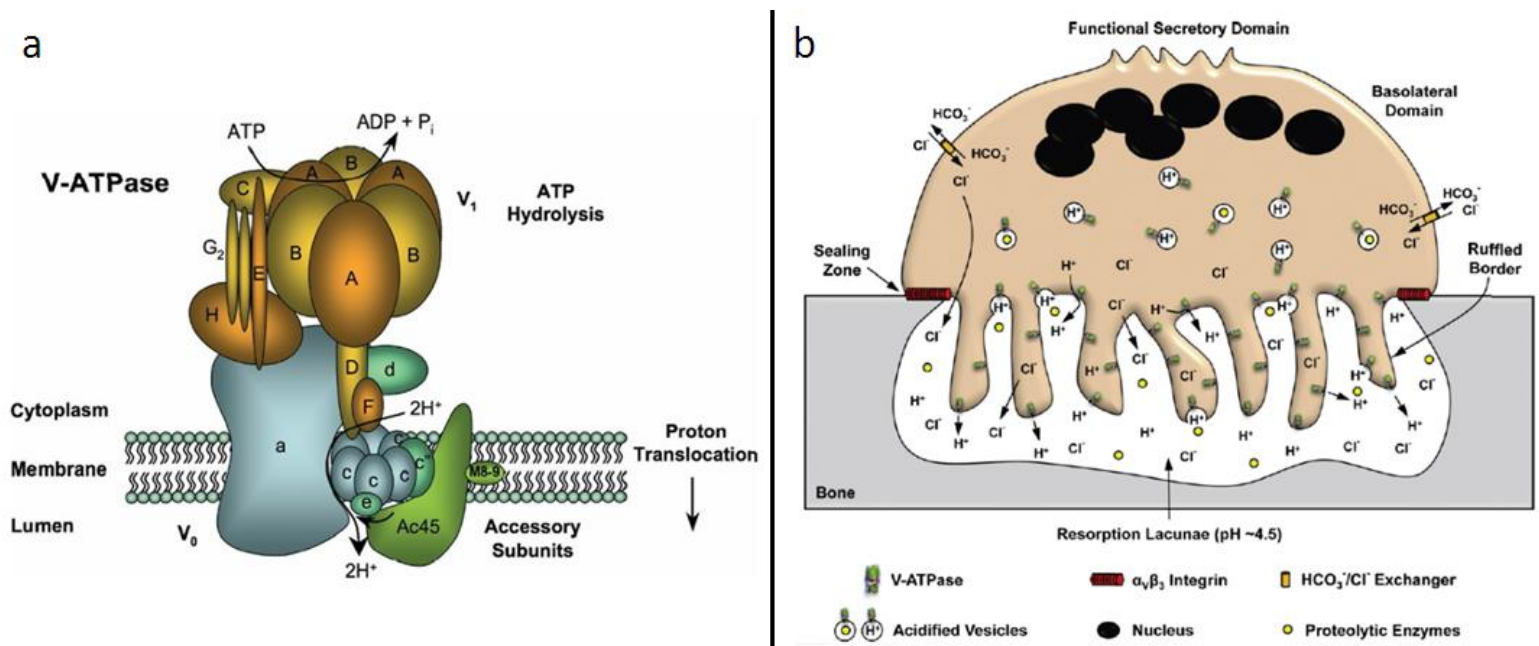


Figura 16 – Diagrama esquemático da bomba de prótons osteoclástica e a sua integração na membrana rugosa do osteoclasto. a) O complexo da ATPase vacuolar é composto por um domínio V1 localizado periféricamente, e um domínio V0 associado à membrana. O domínio V1 consiste em oito diferentes subunidades (A–H) e é responsável pela hidrólise de ATP. O domínio V0 consiste em quatro subunidades (a, c, d, e), sendo responsável pelo transporte de prótons. Existem ainda duas subunidades acessórias (Ac45 e M8-9), mas a sua função exata não é conhecida.<sup>[169]</sup> b) A fusão de vesículas ácidas com a membrana rugosa liberta enzimas proteolíticas e preenche a membrana com bombas de prótons que utilizam ATP para expelir prótons  $H^+$  no espaço de reabsorção. A degradação do mineral orgânico pelo baixo pH, juntamente com a ativação de enzimas que degradam a matriz leva à reabsorção óssea.<sup>[158]</sup>

## Efeito dos IBP no tecido ósseo

Os primeiros estudos sobre a função das células osteoclásticas no processo de reabsorção óssea utilizaram agentes farmacológicos para inibir os mecanismos envolvidos na atividade osteoclástica, tais como a motilidade celular e segregação ácida, sendo os efeitos avaliados por microscopia eletrónica de varrimento.<sup>[181]</sup> Os compostos incluíram a colchicina, um inibidor da motilidade osteoclástica, iões de molibdato, usados para inibir a atividade catalítica das enzimas segregadas, e omeprazol, utilizado no bloqueio da segregação de iões de hidrogénio. Verificou-se que todos os compostos inibiram a reabsorção óssea, apesar de terem afetado processos diferentes, o que demonstra que cada um destes é essencial, e que um bloqueio específico pode constituir um meio de regulação da atividade osteoclástica.

Neste estudo, o omeprazol inibiu completamente a reabsorção óssea. O número de osteoclastos por secção, em comparação com as culturas de controlo, permaneceu inalterado, assim como a motilidade osteoclástica, como verificado através de registos *time-lapse* e medidas empíricas. Não foi também observada uma mudança significativa na área de propagação celular, nem uma elevação relevante nos níveis de enzimas segregadas, nomeadamente a TRAP (*tartrate-resistant acid phosphatase*).<sup>[181]</sup>

Outro estudo utilizou cimentos de fosfato de cálcio, materiais comumente usados para enxerto ósseo. Foi demonstrado que o omeprazol e o pantoprazol (um análogo do omeprazol) eram efetivos na inibição da reabsorção osteoclástica *in vivo*, quando administrados, conjuntamente com os referidos cimentos, em defeitos ósseos. Verificou-se que estes IBP induziram um atraso na reabsorção osteoclástica, demonstrando o efeito de bloqueio da bomba de protões osteoclástica *in vivo*, e o potencial de modulação da reabsorção óssea.<sup>[182]</sup>

Aos mesmos materiais foi ainda adicionada bafilomicina, outro inibidor da ATPase vacuolar, sendo estes implantados no fémur de ratos, e posteriormente avaliada a reabsorção do material e a quantidade de osso formada na sua imediação. Comparativamente ao grupo de controlo, a reabsorção dos materiais com bafilomicina foi significativamente mais baixa. Foi também observada uma grande quantidade de tecido ósseo formado na sua superfície. Foi sugerido que este facto era resultante da difusão do IBP para o tecido envolvente do local de implante, fazendo com que, tal como a reabsorção do material implantado, a reabsorção de novo tecido ósseo tenha sido reduzida, resultando numa maior quantidade de massa óssea do que seria expectável.<sup>[183]</sup>

## Conclusão

A importância do osso no corpo humano é demonstrada, não só pela sua ação de suporte estrutural, como pela regulação metabólica em que se encontra envolvido. Estes processos dependem da constante manutenção da sua integridade, levada a cabo por células ósseas que executam uma renovação óssea permanente. Assim, da formação e reabsorção de tecido ósseo, resulta o crescimento e reparação do osso. Um fator indispensável neste processo é a segregação ácida efetuada pelos osteoclastos, que permite a degradação do tecido ósseo, e tem como principal responsável a bomba de prótons osteoclástica, ou ATPase vacuolar.

Existem diversas variáveis, de natureza física ou fisiológica, que influenciam a remodelação óssea. Em situações normais, esta permanece relativamente constante; no entanto, perturbações neste equilíbrio podem conduzir a doenças ósseas de vários tipos.

Para além das células envolvidas no processo de remodelação óssea, existem outros elementos que compõem o osso, podendo ser classificados segundo a sua natureza orgânica ou inorgânica. Os elementos orgânicos são representados, principalmente, pelo colagénio tipo I, e os inorgânicos, por HA. As interações entre estas duas componentes determinam as características físicas do tecido ósseo, não podendo ser separadas uma da outra.

O atual empenho na criação de HA sintética advém da semelhança entre a parte inorgânica do osso e a HA. Por ser biocompatível e possuir uma grande capacidade osteocondutora, a HA sintética permitiu a substituição dos materiais previamente utilizados, que apresentavam bastantes limitações, sendo hoje fundamentalmente aplicada em implantes ósseos ou no revestimento dos mesmos.

A estabilidade entre o biomaterial e o tecido ósseo é um fator de grande relevância. Neste contexto, a HA nanométrica apresenta uma conformação que fomenta a interação a nível atómico com o tecido ósseo, apresentando, por essa razão, uma maior consistência estrutural. Além disso, a HA nanoestruturada é análoga aos cristais de apatite presentes no corpo humano, pelo que a sua utilização apresenta maiores vantagens biológicas.

Os IBP são usados no tratamento de doenças relacionadas com a acidez excessiva no espaço gastrointestinal. A sua ação resulta no decréscimo da segregação de ácido gástrico, através da inibição da bomba de prótons presente nas células parietais. Do mesmo modo, a segregação ácida dos osteoclastos ocorre pela ação de uma bomba de prótons, a ATPase vacuolar, possibilitando a degradação do tecido ósseo. Assim, através dos IBP, existe um grande potencial de modulação da atividade osteoclástica, por intermédio do controlo da sua ação de acidificação.

No seguimento do desenvolvimento deste projeto, procura-se abordar essa potencial aplicabilidade dos IBP no contexto ósseo. Existem, atualmente, dados que apontam no sentido de haver uma influência dos IBP sobre a osteoclastogénese, havendo, no entanto, pouca informação relacionada com este assunto. O estudo da ação dos IBP sobre a dinâmica osteoclástica, envolvendo hidroxiapatite, possui grande relevância no âmbito da pesquisa de potenciais futuras aplicações em áreas de interesse biomédico, nomeadamente no campo da regeneração óssea.

## ***Parte 2***



## Introdução

A reabsorção óssea é efetuada pelos osteoclastos, pelo que estas células desempenham um papel decisivo no desenvolvimento de patologias ósseas, assim como no processo de implantação e integração de biomateriais para regeneração óssea. Por conseguinte, torna-se necessário aprofundar o conhecimento acerca do seu funcionamento.

Os biomateriais compostos por HA são facilmente osteointegrados, possuindo propriedades ideais para a utilização em contexto ósseo. Quando implantados no osso, funcionam como suporte estrutural, sendo absorvidos à medida que são substituídos por novo tecido ósseo, a uma taxa que pode ser controlada de acordo com as características da HA escolhida. Além disso, podem também ser utilizados como veículos de libertação prolongada de fármacos, o que representa uma enorme vantagem no tratamento de doenças ósseas.

A ação dos IBP bloqueia a segregação de ácido por parte dos osteoclastos, através da inibição da bomba de prótons vacuolar. Considerando este facto, levanta-se a possibilidade da utilização destes fármacos de modo a modular a atividade osteoclástica. Assim, o presente trabalho pretende aprofundar o conhecimento sobre o potencial de aplicação dos IBP neste contexto, pois pensa-se que estes fármacos exerçam influência sobre a osteoclastogénese. Foi utilizada HA como substrato dos meios de cultura celulares, onde se avaliou a ação dos IBP sobre a atividade das células osteoclásticas, pois esta conjugação demonstra ser extremamente relevante na pesquisa de futuras aplicações no campo da regeneração óssea.

Deste modo, avaliou-se, na superfície nano e microestruturada da HA, a modulação da osteoclastogénese pelos IBP, usando precursores osteoclásticos isolados a partir de células mononucleares do sangue periférico humano. Estas células foram mantidas na presença dos fatores osteoclastogénicos M-CSF e RANKL, diferenciando-se em osteoclastos. Posteriormente, foram administrados três IBP, o omeprazol, esomeprazol, e lansoprazol. A resposta celular foi caracterizada através da quantificação de ADN total, atividade da TRAP, e capacidade de reabsorção de  $\text{Ca}^{2+}$ . As culturas celulares foram ainda visualizadas por microscopia eletrónica de varrimento, e foi observada, por microscopia ótica confocal, a existência de células com anéis de actina e com a expressão de VNR e CTR. Foi ainda analisado, na presença e ausência de IBP, o envolvimento das vias de sinalização MEK, NF- $\kappa$ B, JNK e p38 MAPK.

## Materiais e métodos

### Preparação das pastilhas de HA micro e nanoestruturadas

A preparação das pastilhas de HA microestruturada (Plasma Biotallimited) e nanoestruturada (Fluidinova S.A. - Portugal, nanoXIM.HAp202) envolveu a utilização de um molde (Figura 17), no qual foram depositados 75 mg de pó de HA por pastilha, sendo esta compactada através de uma prensa uniaxial (Mestra snow P3) (Figura 18), a uma pressão de sensivelmente 20 Bar. Foi utilizada, para a pesagem do pó, uma balança analítica (Mettler Toledo AB204-S), sendo o diâmetro e espessura dos discos preparados medidos através de um paquímetro digital Mitutoyo.



Figura 17 - Molde usado para a preparação de pastilhas de HA (desmontado e montado).



Figura 18 - Prensa uniaxial utilizada na compactação do pó de HA.

Após a compactação do pó na forma de pastilha, procedeu-se à sua sinterização, utilizando temperaturas diferentes de acordo com a cristalinidade. Assim, utilizou-se, para as pastilhas de HA microestruturada, uma temperatura de sinterização de 1300°C, com um patamar de 1 hora, e uma taxa de aquecimento de 4°C/min. Por sua vez, as pastilhas de HA nanoestruturada foram sinterizadas a uma temperatura de 830°C, com um patamar de 15 minutos e uma taxa de aquecimento de 20°C/min. O arrefecimento de ambos os tipos de pastilhas (Figura 19) realizou-se no interior do forno desligado, até ser atingida a temperatura ambiente.

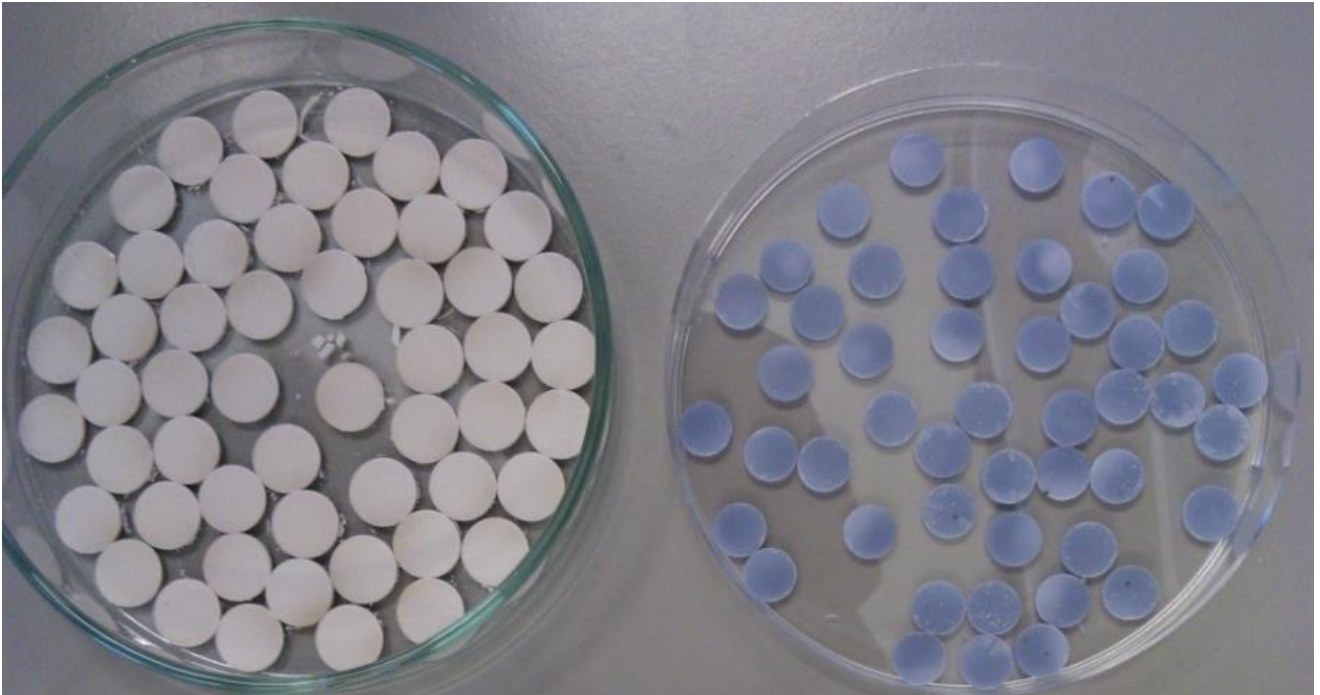


Figura 19 - Pastilhas sinterizadas de HA nanoestruturada (esquerda) e microestruturada (direita).

## Culturas de precursores osteoclásticos

### Isolamento de células mononucleadas de sangue periférico humano

Foram utilizadas, como precursores osteoclásticos, células mononucleadas de sangue periférico humano (*peripheral blood mononuclear cells* - PBMC), isoladas a partir de sangue proveniente de doadores do sexo masculino, com idades compreendidas entre os 25 e os 35 anos. Primeiramente, diluiu-se o sangue na proporção de 1:2 em PBS suplementado com 2 mM de EDTA, sendo este transferido para tubos com Ficoll-Paque<sup>TM</sup> PREMIUM (GE Healthcare Bio-Sciences). Em seguida, procedeu-se à sua centrifugação a 400g, por um período de 30 minutos, após o qual se recolheram e transferiram as PBMC para um novo tubo (Figura 20), tendo sido, mais uma vez, adicionado PBS + 2 mM de EDTA, assim como realizada nova centrifugação a 400g, por um período de 10 minutos. Após descartar o sobrenadante, os dois últimos passos foram repetidos. Para concluir, foi novamente adicionado PBS e efetuou-se a contagem das PBMC num hematocítmetro (Celltac MEK-5103).

### Culturas celulares

As PBMC foram semeadas sobre as pastilhas de HA micro e nanoestruturada, a uma densidade de  $1,5 \times 10^6$  células/cm<sup>2</sup>, em placas com 48 poços. As culturas celulares foram mantidas em  $\alpha$ -MEM (*Alpha modified minimum essential medium*), suplementado com 30% (V/V) de soro humano dos mesmos doadores das PBMC, 100 IU/mL de penicilina, 2,5  $\mu$ g/mL de estreptomicina, 2,5  $\mu$ g/mL de anfotericina e 2 mM de L-glutamina. O meio de cultura foi suplementado com dois fatores osteoclastogénicos, M-CSF (25ng/mL) e RANKL (40ng/mL) (M+R), e mantido na ausência (controlo) ou presença de diferentes concentrações ( $10^{-7}$ M a  $10^{-4}$ M) de três IBP (omeprazol, esomeprazol e lansoprazol) (Figura 20). Adicionalmente, as culturas celulares foram tratadas com a menor concentração de cada IBP que promoveu um efeito significativo no comportamento osteoclástico ( $10^{-6}$ M), e suplementadas com diferentes inibidores de vias de sinalização (IVS) importantes para a osteoclastogénese<sup>[184]</sup>, os quais se encontram indicados na Tabela 2.

Tabela 2 - Inibidores das vias de sinalização utilizados.

Inibidor	Concentração ( $\mu$ M)	Via de sinalização inibida
U0126	1	MAPK/ERK kinases (MEK)
PDTC	10	Nuclear Factor-kappa B (NF-kB)
SP600125	10	c-Jun N-terminal Kinase (JNK)
SB202190	5	p38 mitogen-activated protein kinase

As culturas celulares foram mantidas numa atmosfera húmida com 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C, por um período de 21 dias, sendo o meio de cultura substituído uma vez por semana (Figura 20). Retiraram-se amostras ao 14º e 21º dia, de modo a quantificar a atividade da TRAP, o ADN celular, a atividade de reabsorção de HA, e a apoptose, assim como para observar a morfologia celular, através de microscopia ótica confocal e microscopia eletrónica de varrimento (*scanning electron microscopy* - SEM).

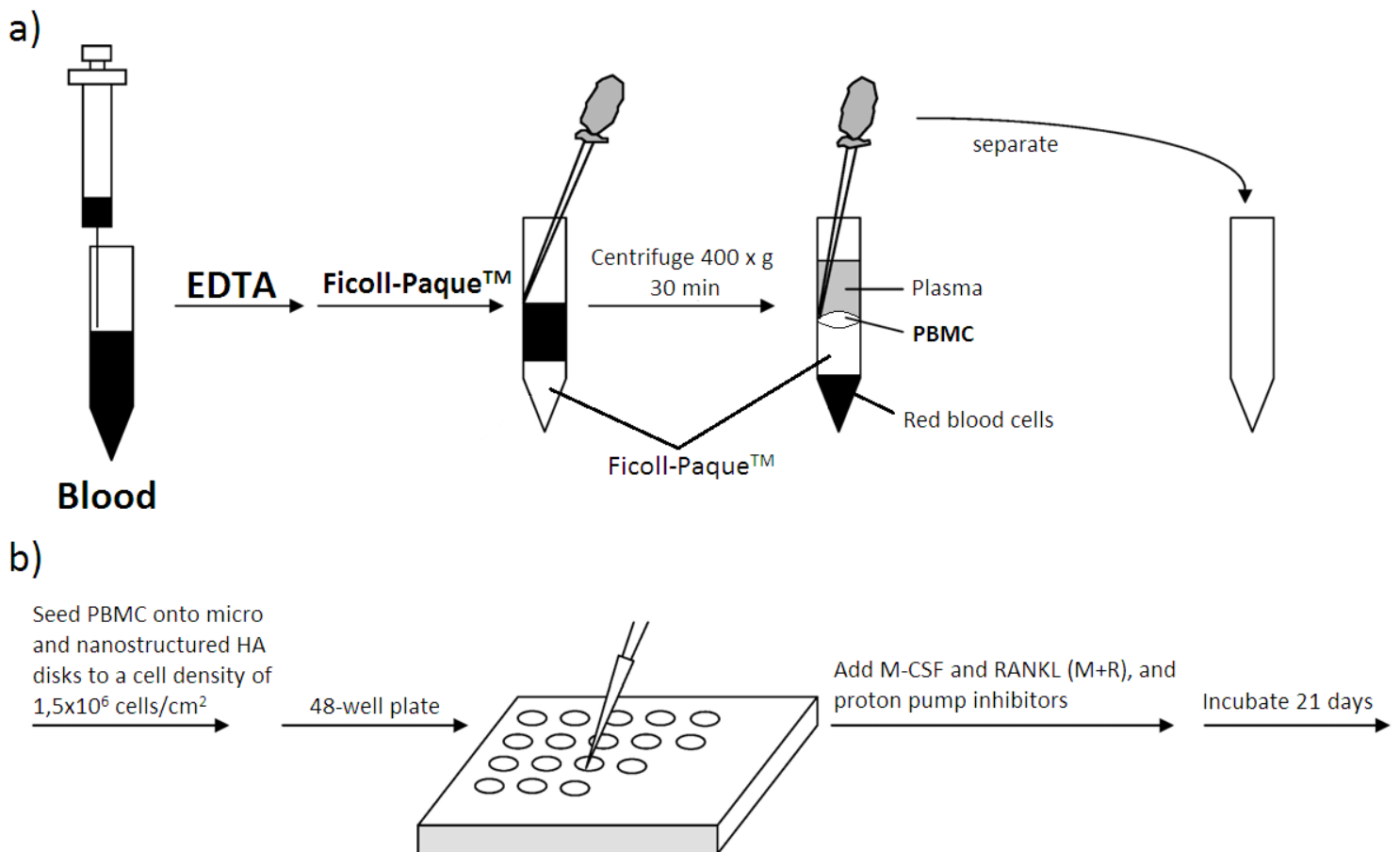


Figura 20 - Culturas de precursores osteoclásticos. a) Isolamento de células mononucleadas de sangue periférico humano (PBMC): as PBMC (precursores osteoclásticos) foram isoladas a partir de sangue humano, o qual foi diluído em PBS e suplementado com EDTA, sendo então transferido para tubos com Ficoll-Paque™ PREMIUM. Centrifugou-se o sangue, tendo-se então recolhido e transferido as PBMC para um novo tubo. Após descartar o sobrenadante, foi novamente adicionado PBS e efetuou-se a contagem das PBMC num hematocítmetro. b) Culturas celulares: semearam-se então as PBMC sobre pastilhas de HA micro e nanoestruturadas, sendo as culturas mantidas em  $\alpha$ -MEM suplementado com soro humano, antibióticos, antifúngicos e aminoácidos. O meio de cultura foi ainda suplementado com M-CSF e RANKL, e as culturas foram mantidas na ausência (controle) ou presença de diferentes concentrações omeprazol, esomeprazol e lansoprazol, por um período de 21 dias. Imagem adaptada de [185].

## Quantificação da atividade da TRAP

A TRAP (*tartrate-resistant acid phosphatase*) é uma enzima segregada pelos osteoclastos durante a sua atividade. Por essa razão, é utilizada como marcador do processo reabsortivo, sendo a quantidade libertada proporcional à taxa de reabsorção.

A atividade da TRAP foi quantificada através do método colorimétrico de hidrólise de *p*NPP, um substrato cromogénico que, quando hidrolisado por uma fosfatase, origina *para*-nitrofenol. Este composto, num meio alcalino, exibe uma cor amarela, permitindo a leitura da absorvância, que se relaciona com a quantidade de TRAP presente.

Assim, as culturas celulares foram lavadas 2 vezes com PBS, tendo sido solubilizadas com 0,1% Triton X-100 (V/V) e incubadas à temperatura ambiente durante 15 minutos. Foi acrescentada uma solução de 22,5mM *p*NPP, preparada em 0,225M de acetato de sódio, 0,3375M de KCl, 0,1% Tx-100, 22,5mM de tartarato de sódio, e 0,225mM de cloreto de ferro, a um pH de 5,8. Incubou-se 1 hora a 37°C, tendo-se bloqueado a reação através da adição de NaOH 5M. Em seguida, determinou-se a absorvância a 400nm num leitor de ELISA (Synergy HT, Biotek). A atividade da TRAP foi normalizada tendo em consideração a concentração de ADN celular total para cada condição experimental, sendo os resultados apresentados em  $\text{nmol}/\text{min} \cdot \mu\text{g}^{-1}_{\text{ADN}}$ .

## Quantificação do ADN

A quantificação do ADN foi efetuada com o Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit, segundo as instruções do fabricante. As células foram incubadas com o corante PicoGreen, e a fluorescência transmitida foi quantificada num fluorímetro (Synergy HT, Biotek), com um comprimento de onda de excitação a 485nm, e de emissão a 528nm.

## Microscopia Ótica Confocal

As culturas celulares foram lavadas duas vezes com PBS, tendo sido fixadas com 3,7% (v/v) de *para*-formaldeído à temperatura ambiente, por um período de 15 minutos. Em seguida, foram novamente lavadas com PBS por duas vezes, e marcadas para a actina com 5U/mL Alexa Fluor® 647-Faloidina (Invitrogen), e para os recetores da vitronectina e da calcitonina (VNR e CTR, respetivamente) com 50µg/mL IgGs de rato anti-VNR e anti-CTR (R&D Systems). A deteção das IgGs anti-VNR e anti-CTR foi efetuada com 2µg/mL IgGs anti-rato marcados com Alexa Fluor® 488 (Invitrogen). No final, as culturas celulares foram visualizadas por microscopia ótica confocal.

## **Microscopia Eletrônica de Varrimento**

Lavaram-se as culturas celulares duas vezes com PBS, sendo as células fixadas com 1,5% glutaraldeído (preparado em 0,14M cacodilato de sódio) durante 10 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, as culturas foram lavadas duas vezes com água destilada, e procedeu-se à desidratação das amostras, utilizando séries de diferentes soluções de etanol, até se atingir o ponto crítico. Posteriormente, foram revestidas com paládio-ouro e observadas através de microscopia eletrônica de varrimento, num microscópio equipado com um espectroscópio de dispersão de energias de raios-X FEI Quanta 400FEG/EDAX Pegasus X4M sob condições de vácuo.

## **Quantificação do $\text{Ca}^{2+}$ extracelular**

Ao sétimo dia de incubação, o meio de cultura foi substituído por um meio sem cálcio. Ao 14º e 21º dia determinou-se a concentração de cálcio existente, através do *kit* de quantificação Calcifluor™. A fluorescência transmitida foi determinada num fluorímetro (Synergy HT, Biotek).

## Resultados

### Caracterização da diferenciação osteoclástica das culturas de PBMC na presença de IBP

#### Quantidade total de ADN

As culturas de PBMC, efetuadas na superfície das pastilhas de HA micro e nanoestruturada, foram mantidas na presença de fatores osteoclastogénicos (RANKL e M-CSF), e na ausência (controlo) ou presença de três diferentes IBP (omeprazol, esomeprazol e lansoprazol), tendo sido caracterizadas ao 14º e 21º dia, relativamente à quantidade total de ADN (Figuras 21 e 22).

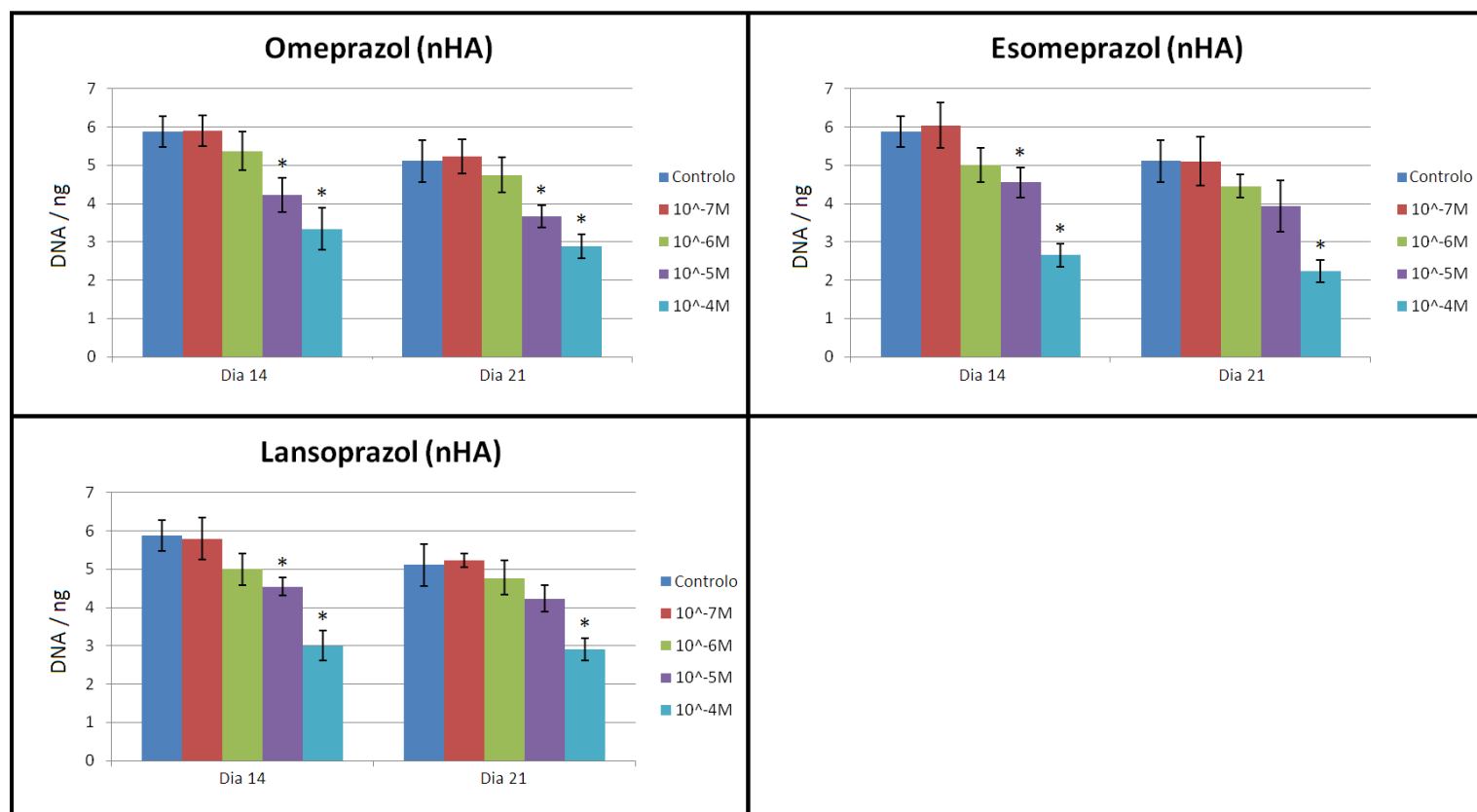


Figura 21 - Efeito das diferentes concentrações dos IBP utilizados na quantidade total de ADN das culturas de PBMC na superfície de pastilhas de nHA. \* Significativamente diferente do controlo.

A quantificação de ADN permite uma informação aproximada sobre a densidade celular de cada condição experimental. Assim, verificou-se que os IBP utilizados promoveram um padrão de resultados semelhantes, de acordo com as diferentes concentrações administradas. Globalmente, a resposta celular diminuiu com o aumento da concentração dos IBP.



Comparativamente com o controlo, ao 21º dia, a maior concentração de IBP utilizada ( $10^{-4}$  M) causou a diminuição mais significativa na densidade celular. A inibição mais expressiva deu-se com o esomeprazol (~56%), seguida pelo omeprazol (~44%) e, por fim, o lansoprazol (~43%) (Figura 21).

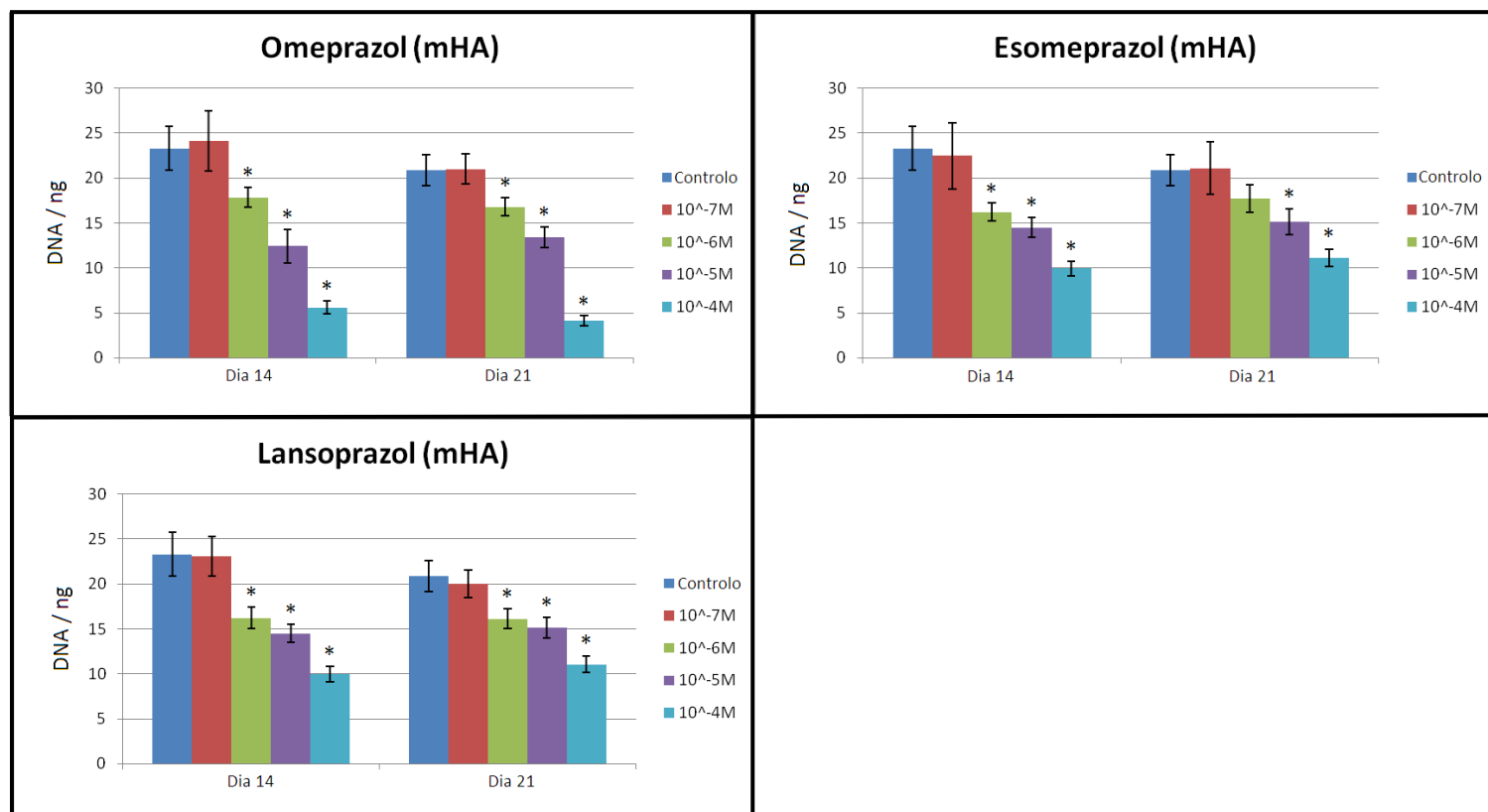


Figura 22 - Efeito das diferentes concentrações dos IBP utilizados na quantidade total de ADN das culturas de PBMS na superfície de pastilhas de mHA. \* Significativamente diferente do controlo.

As diferentes concentrações de IBP causaram, nas pastilhas de mHA, um efeito na densidade celular semelhante ao causado nas pastilhas nHA, ou seja, comparativamente ao controlo, a concentração de  $10^{-4}$  M foi, ao 21º dia, aquela que originou uma maior diminuição da densidade celular. O omeprazol gerou a maior inibição (~80%), seguido pelo esomeprazol (~47%), e pelo lansoprazol (~47%) (Figura 22).

## Atividade da TRAP

A atividade da TRAP foi avaliada ao 14º e 21º dia, tendo sido utilizadas, nas culturas celulares, quatro diferentes concentrações de cada IBP ( $10^{-7}$  M,  $10^{-6}$  M,  $10^{-5}$  M e  $10^{-4}$  M). Os resultados apresentados encontram-se normalizados com a quantidade total de ADN correspondente (Figuras 23 e 24).

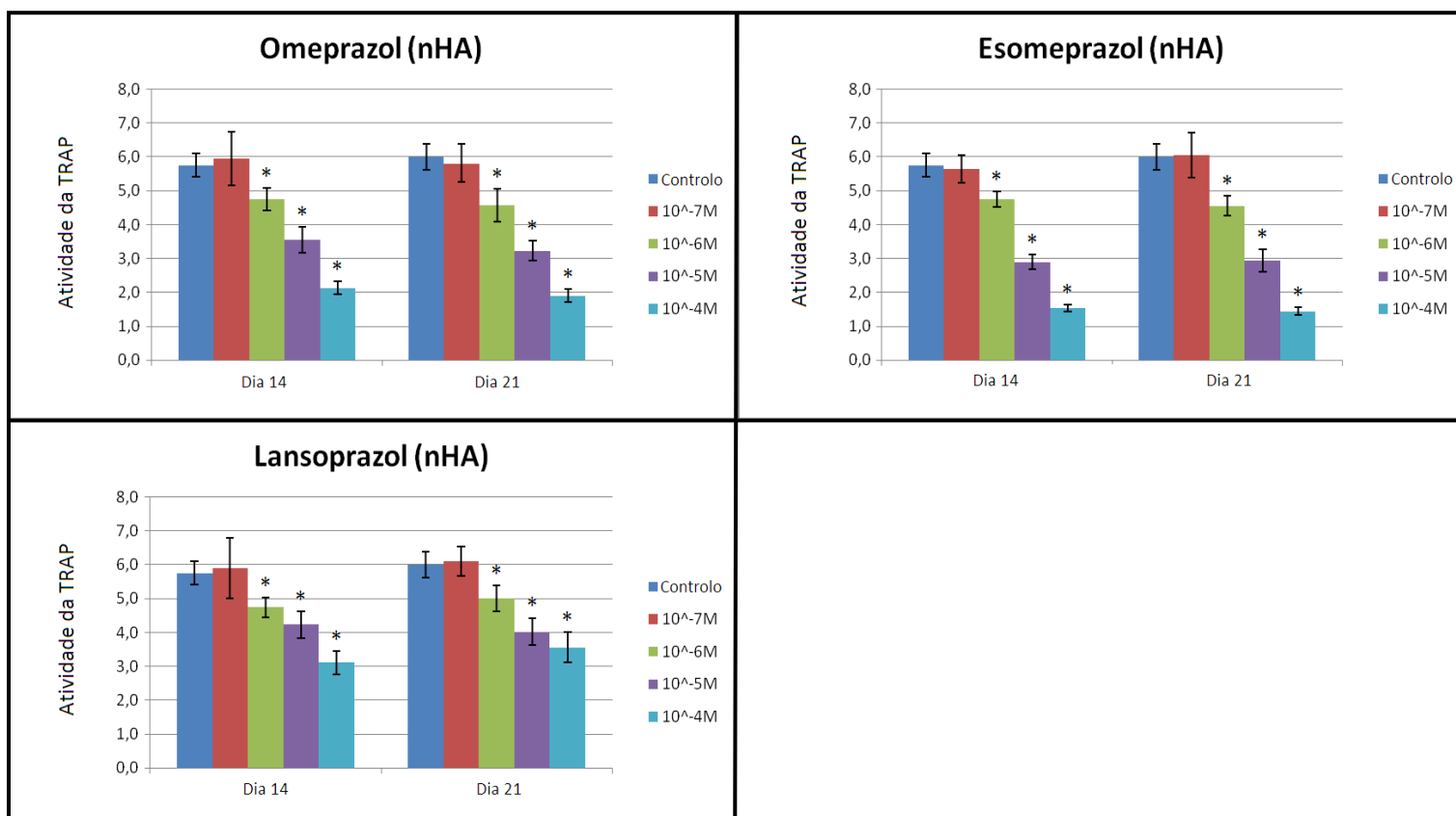


Figura 23 - Efeito das diferentes concentrações dos IBP utilizados na atividade da TRAP das culturas de PBMS na superfície de pastilhas de nHA. \* Significativamente diferente do controlo.

A atividade da TRAP foi afetada por todos os IBP utilizados, sendo os efeitos dependentes da dose administrada. Os valores revelaram-se semelhantes entre os dias 14 e 21, e tornaram-se significativamente diferentes do controlo a partir da concentração  $10^{-6}$ M, para todos os IBP testados (a inibição provocada pelo omeprazol foi de ~24%, pelo esomeprazol, ~24% e, pelo lansoprazol, ~17%).

Entre os IBP utilizados, o esomeprazol causou o efeito inibitório mais significativo, ao 21º dia, com a concentração de  $10^{-4}$  M (~76%), seguido pelo omeprazol (~68%) e, finalmente, pelo lansoprazol (~41%) (Figura 23).

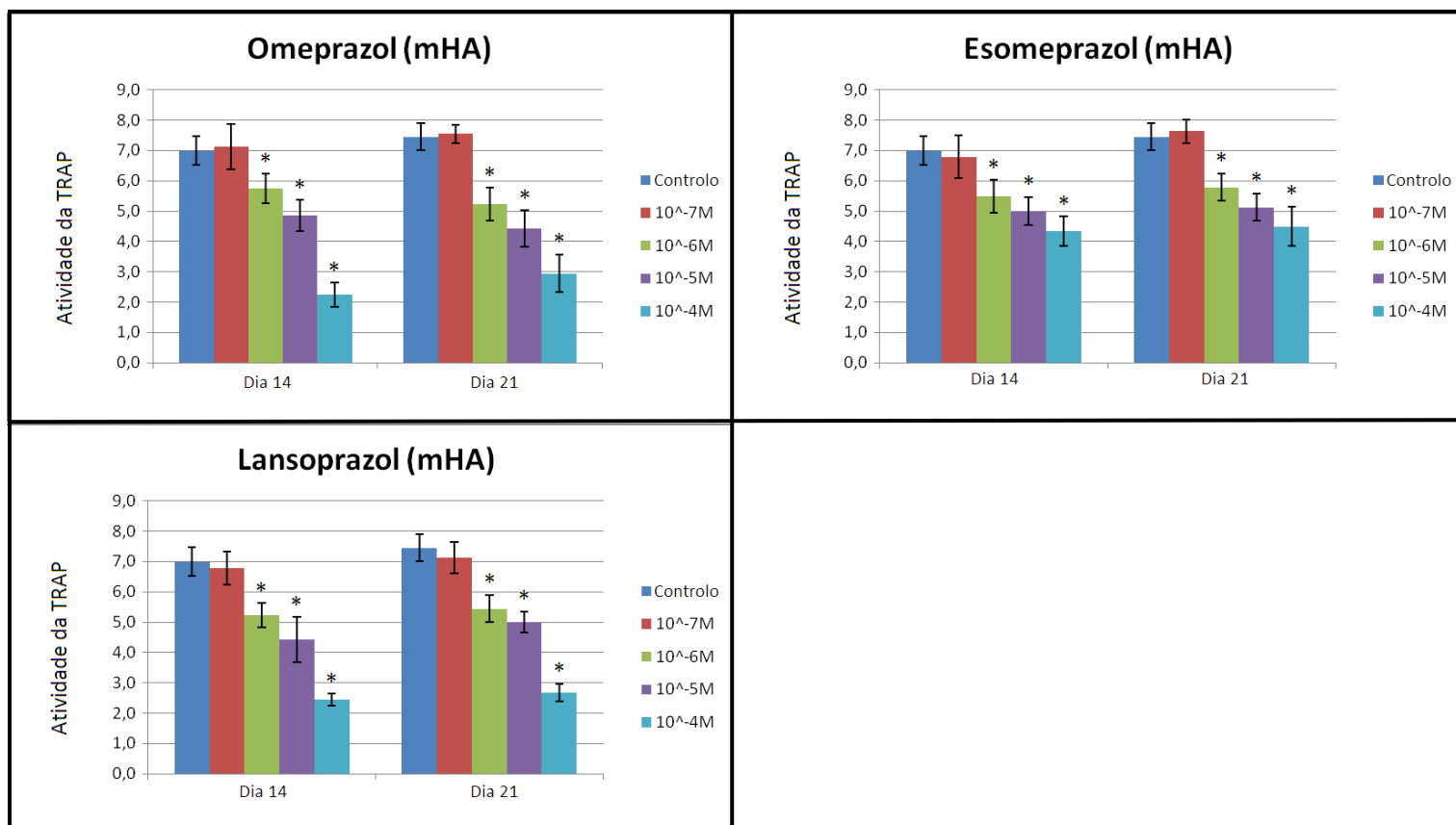


Figura 24 - Efeito das diferentes concentrações dos IBP utilizados na atividade da TRAP das culturas de PBMS na superfície de pastilhas de mHA. \* Significativamente diferente do controle.

Tal como verificado nas culturas celulares efetuadas sobre a HA nanoestruturada, os IBP promoveram uma diminuição da resposta celular dependente da concentração de cada fármaco. Os efeitos tornaram-se estatisticamente significativos a partir da concentração  $10^{-6}M$  (o omeprazol causou uma inibição de ~30%, o esomeprazol de ~22%, e o lansoprazol de ~27%).

O efeito inibitório mais significativo, quando comparado com o controle, foi obtido ao 21º dia, com a concentração  $10^{-4}M$ , pelo lansoprazol (~64%), seguido pelo omeprazol (~60%) e, finalmente, o esomeprazol (~40%) (Figura 24).

## Apoptose

A apoptose das culturas de PBMC, efetuadas na superfície das pastilhas de nHA e mHA, foi quantificada através do doseamento da atividade da caspase-3. Mantiveram-se as culturas na presença de fatores osteoclastogênicos (RANKL e M-CSF), e na ausência (controle) ou presença de omeprazol, esomeprazol e lansoprazol, sendo as mesmas caracterizadas ao 14º e 21º dia (Figuras 25 e 26).

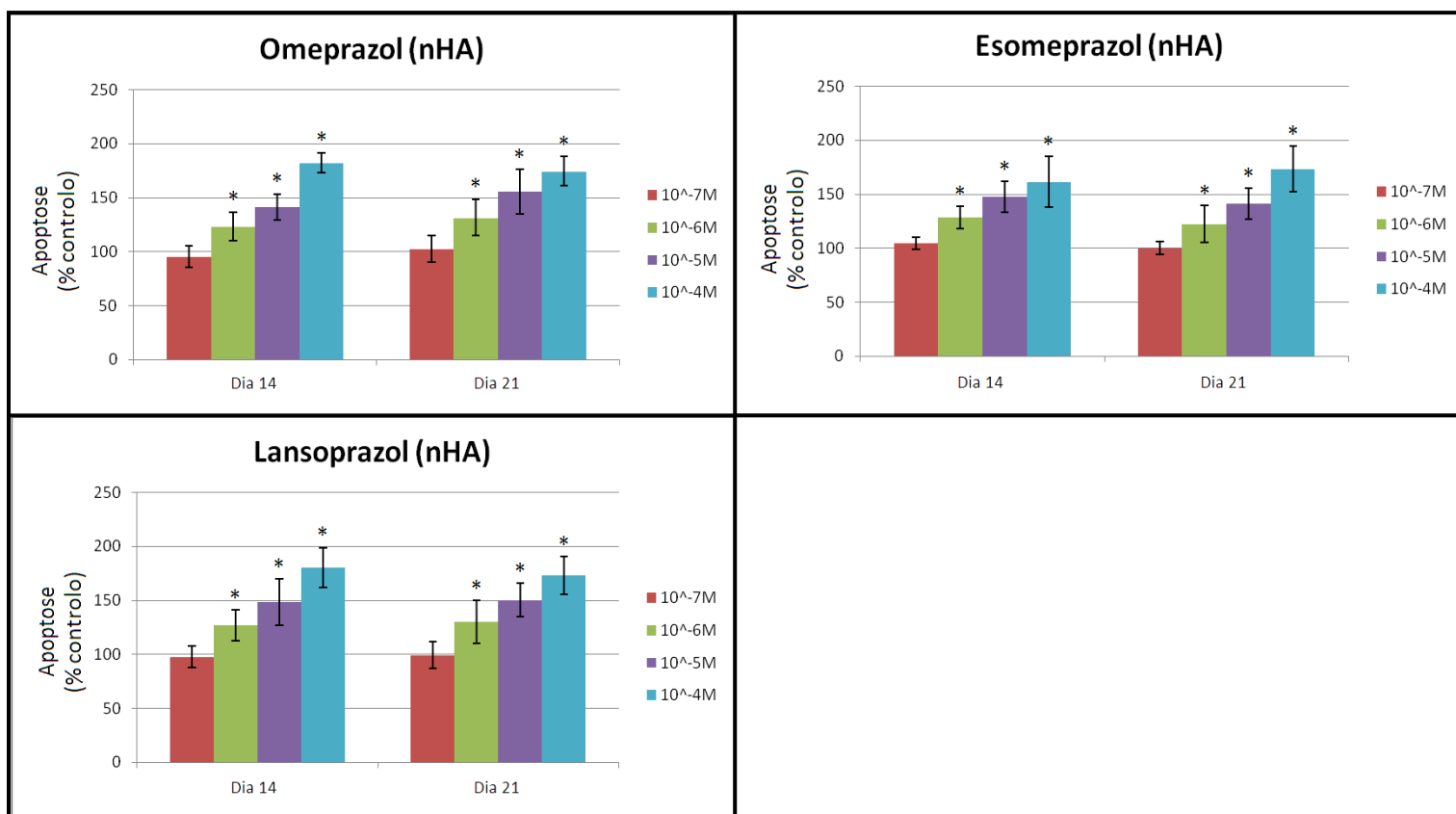


Figura 25 - Efeito das diferentes concentrações dos IBP utilizados na apoptose celular das culturas de PBMS na superfície de pastilhas de nHA. \* Significativamente diferente do controle.

Os resultados obtidos seguiram um padrão dependente das concentrações dos IBP utilizados, não tendo sido observadas diferenças importantes entre os diferentes fármacos.

Ao 21º dia, a menor concentração de IBP utilizada ( $10^{-7}$  M) não causou diferenças significativas na apoptose. Por outro lado, as concentrações mais elevadas promoveram, relativamente ao controle, um aumento expressivo da atividade da caspase-3, particularmente a concentração de  $10^{-4}$  M (omeprazol (~75%), esomeprazol (~73%), e lansoprazol (~73%)) (Figura 25).

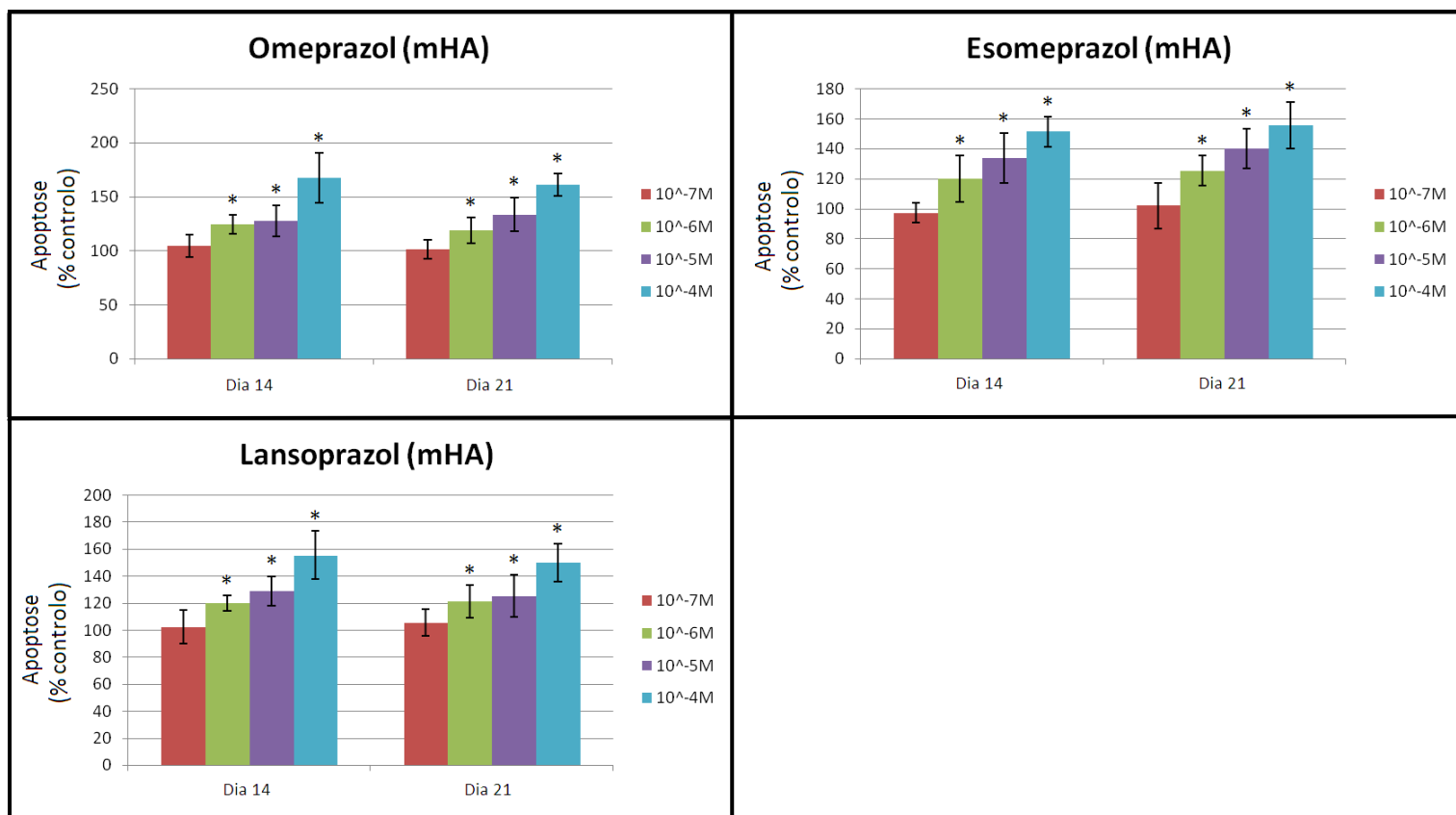


Figura 26 - Efeito das diferentes concentrações dos IBP utilizados na apoptose celular das culturas de PBMS na superfície de pastilhas de mHA. \* Significativamente diferente do controle.

As diferentes concentrações de IBP causaram, na apoptose das culturas realizadas nas pastilhas de mHA, um efeito semelhante àquele sentido nas pastilhas de nHA. Por conseguinte, verificou-se que a atividade da caspase-3 não foi afetada pela concentração  $10^{-7} M$  e que, por outro lado, existiu um aumento da resposta celular, relativamente ao controle, causado pela administração de concentrações superiores, em particular a concentração  $10^{-4} M$  (omeprazol (~61%), esomeprazol (~56%) e lansoprazol (~50%)) (Figura 26).

## Caracterização do envolvimento das vias de sinalização na resposta celular na presença de IBP

### Quantidade total de ADN

Foi avaliada a quantidade total de ADN nas culturas de PBMC, realizadas na superfície de pastilhas de HA micro e nanoestruturada, e mantidas na ausência e presença da menor concentração de cada IBP utilizado que causou um efeito significativo no comportamento osteoclástico ( $10^{-6}$  M).

Além disso, as culturas foram também suplementadas com diferentes inibidores das vias de sinalização (IVS) implicados na osteoclastogénese: U0126 (1  $\mu$ M), PDTC (10  $\mu$ M), SP600125 (10  $\mu$ M), SB202190 (5  $\mu$ M). Os dados foram recolhidos ao 14º e 21º dia (Figuras 27 e 28).

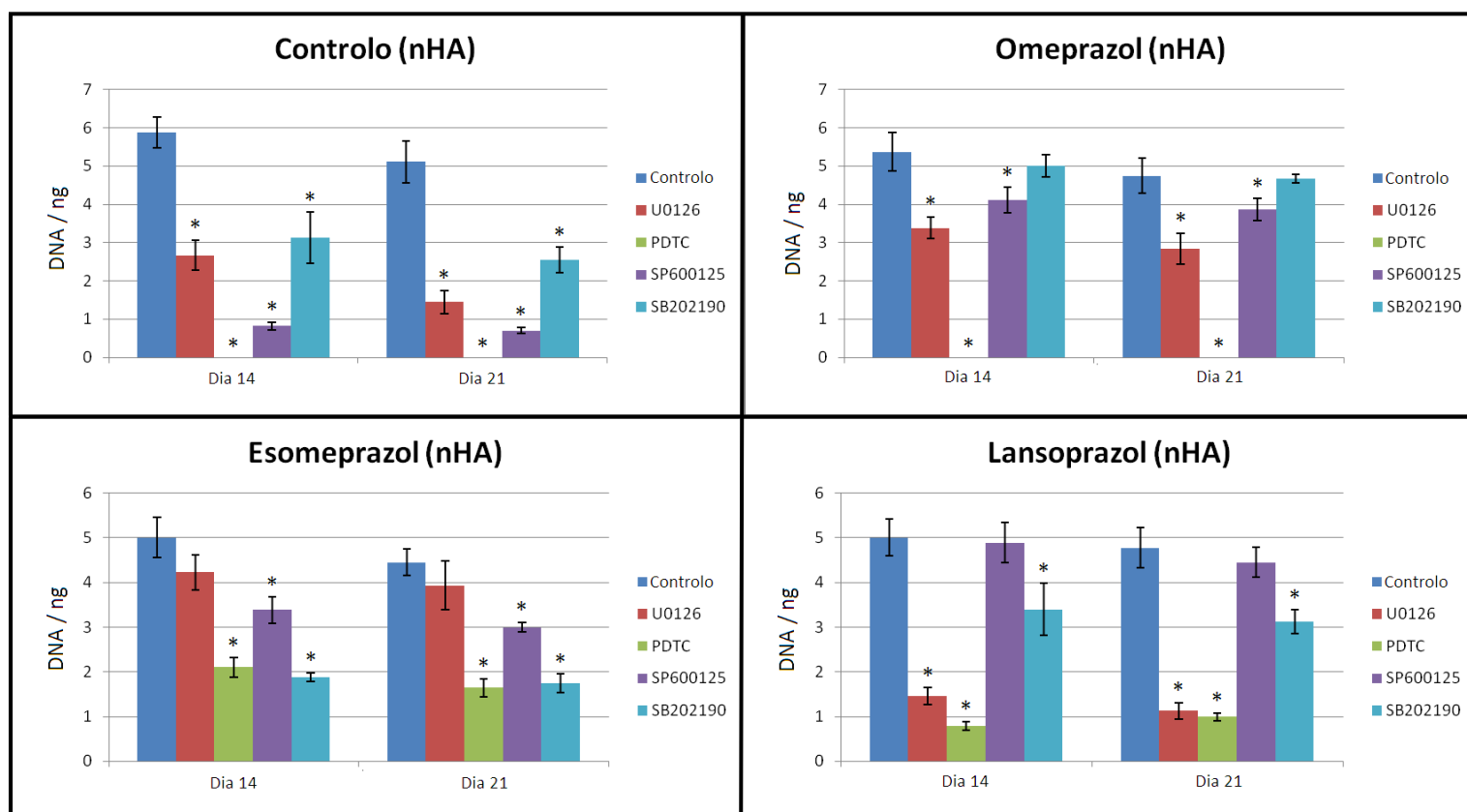


Figura 27 - Quantificação de ADN nas culturas de PBMC na superfície de pastilhas nHA, tratadas com diferentes IBP na concentração de  $10^{-6}$  M, na presença ou ausência de diferentes inibidores das vias de sinalização. \* Significativamente diferente do controlo.

Foi demonstrado que os IVS utilizados afetaram negativamente as culturas celulares nas pastilhas de nHA, pois os valores relativos à quantidade total de ADN foram mais baixos em comparação com as culturas sem os mesmos.

Ao 21º dia, o U0126 causou um efeito inibitório significativo nas culturas sem IBP (~72%). Quando utilizados IBP, este efeito mostrou-se inferior, com omeprazol (~40%) e esomeprazol (~12%), e semelhante, com a administração do lansoprazol (~76%). O PDTC causou uma inibição total (~100%), tanto na ausência de IBP, como na presença de omeprazol. Esta inibição foi apenas parcial na presença de esomeprazol (~63%) e lansoprazol (~79%). O SP600125 causou uma inibição significativa na ausência de IBP (~86%), sendo, na presença de IBP, a inibição bastante inferior: omeprazol (~19%), esomeprazol (~33%) e lansoprazol (sem inibição significativa). O efeito inibitório menos acentuado, na ausência de IBP, foi originado pelo SB202190 (~50%). A inibição foi maior com a administração de esomeprazol (~61%), e menor com a de lansoprazol (~35%), enquanto, na presença de omeprazol, não se verificou nenhuma diminuição da resposta celular (Figura 27).

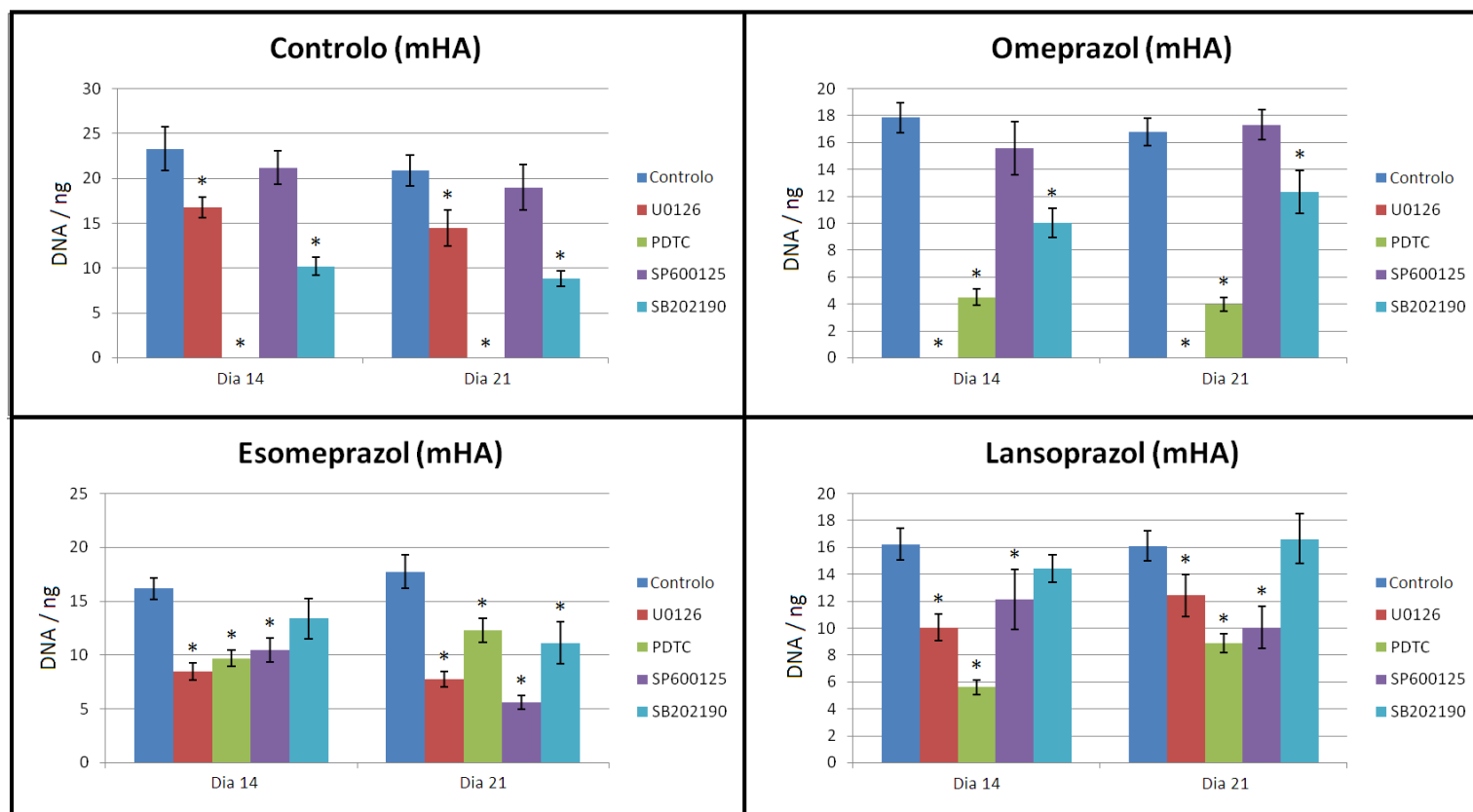


Figura 28 - Quantificação de ADN nas culturas de PBMC na superfície de pastilhas mHA, tratadas com diferentes IBP na concentração de  $10^{-6}$  M, na presença ou ausência de diferentes inibidores das vias de sinalização. \* Significativamente diferente do controlo.

Nas culturas de PBMC efetuadas em pastilhas microestruturadas, mantidas na ausência de IBP, o U0126 promoveu um efeito inibitório de ~31%. Este efeito foi mais

significativo quando administrado o esomeprazol (~56%), e total com o omeprazol (~100%). Pelo contrário, na presença de lansoprazol, o efeito inibitório do U0126 foi inferior ao controlo (~23%). O PDTC causou uma inibição completa na ausência de IBP. No entanto, esta inibição foi apenas parcial quando administrado omeprazol (~76%), esomeprazol (~31%) e lansoprazol (~45%). Na ausência de IBP, o SP600125 promoveu um efeito inibitório pouco significativo relativamente ao controlo (~9%). Quando utilizados o esomeprazol e o lansoprazol, a inibição foi mais significativa (~68% e ~38%, respetivamente). Na presença de omeprazol, não foi observado nenhum efeito relevante. A inibição fomentada pelo SB202190, sem a presença de IBP, obteve um valor de ~58%. Na presença do omeprazol e esomeprazol, este efeito não foi tão acentuado (~27% e ~37%, respetivamente), não se tendo verificado qualquer efeito de relevância na presença de lansoprazol (Figura 28).



## Atividade da TRAP

Avaliou-se, ao 14º e 21º dia, a atividade da TRAP nas culturas de PBMC efetuadas na superfície de pastilhas de nHA e mHA. Estas foram mantidas na presença da menor concentração de IBP que causou um efeito relevante na ação osteoclástica ( $10^{-6}$  M), e suplementadas com diferentes inibidores das vias de sinalização relacionados com a osteoclastogênese: U0126 (1  $\mu$ M), PDTC (10  $\mu$ M), SP600125 (10  $\mu$ M) e SB202190 (5  $\mu$ M). Os resultados recolhidos foram normalizados com a quantificação de ADN correspondente (Figuras 29 e 30).

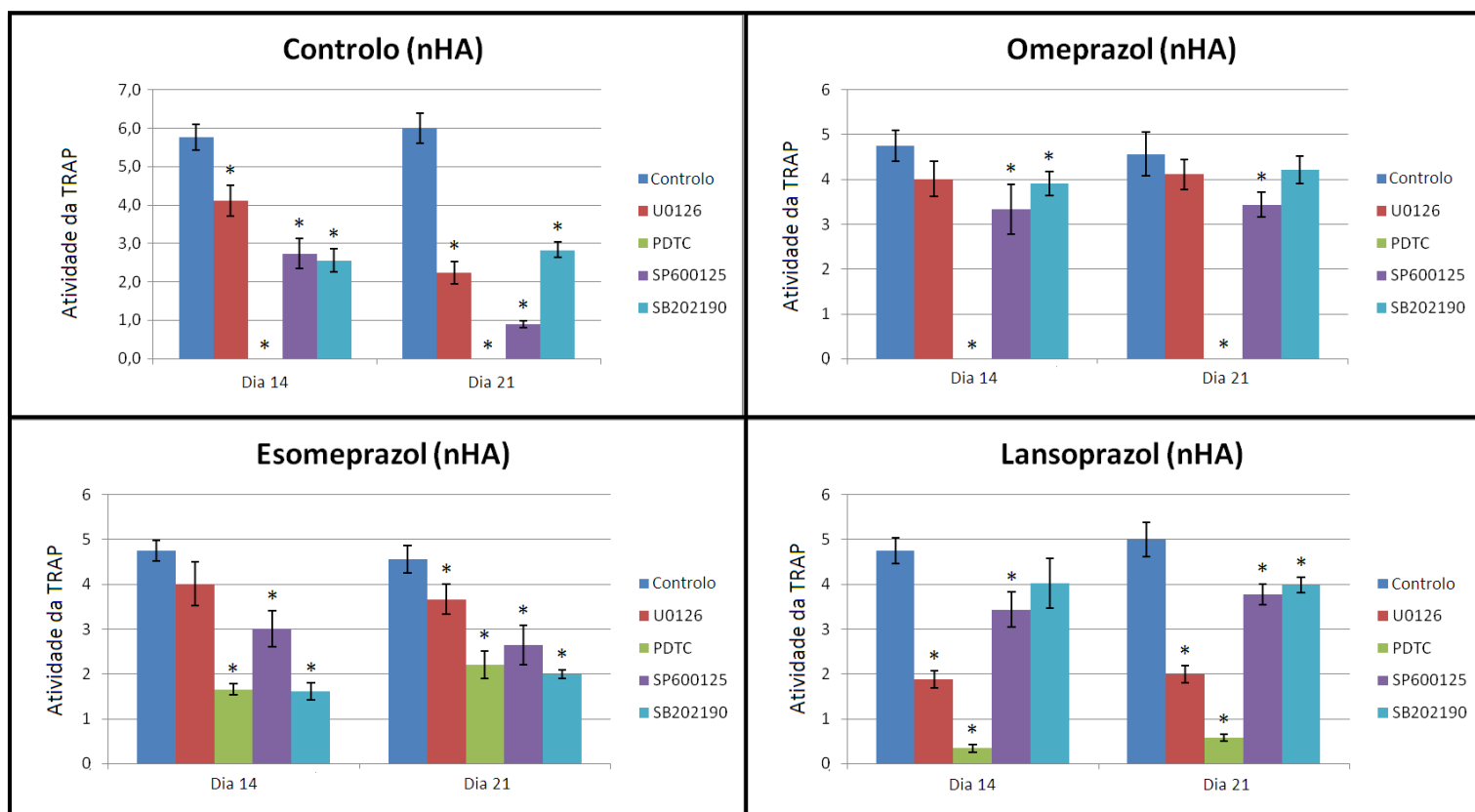


Figura 29 - Quantificação da atividade da TRAP nas culturas de PBMC na superfície de pastilhas nHA, tratadas com diferentes IBP na concentração de  $10^{-6}$  M, na presença ou ausência de diferentes inibidores das vias de sinalização. \* Significativamente diferente do controlo.

Verificou-se que a atividade da TRAP foi negativamente afetada pelos IVS administrados. Comparativamente ao controlo, na ausência de IBP, o U0126 causou uma diminuição significativa na atividade da TRAP (~63%). A administração de IBP contrariou este efeito, sendo a inibição causada menor (lansoprazol com ~60%, e esomeprazol com ~20%), ou irrisória (omeprazol). O PDTC originou uma inibição total (~100%) na ausência de IBP, assim como na presença de omeprazol. Esta inibição foi apenas parcial quando administrado esomeprazol (~52%) e lansoprazol (~88%). O

SP600125 promoveu uma redução expressiva da atividade da TRAP na ausência de IBP (~85%). O efeito foi menor com a administração destes fármacos (~25%, ~42% e ~24% para o omeprazol, esomeprazol e lansoprazol, respetivamente). Nas culturas sem IBP, o SB202190 causou um decréscimo relevante na atividade da TRAP (~53%). A inibição obteve valores inferiores na presença de lansoprazol (~20%), e insignificantes com a utilização de omeprazol, tendo, no entanto, sido superior com o esomeprazol (~56%). Todos os resultados descritos correspondem ao 21º dia (Figura 29).

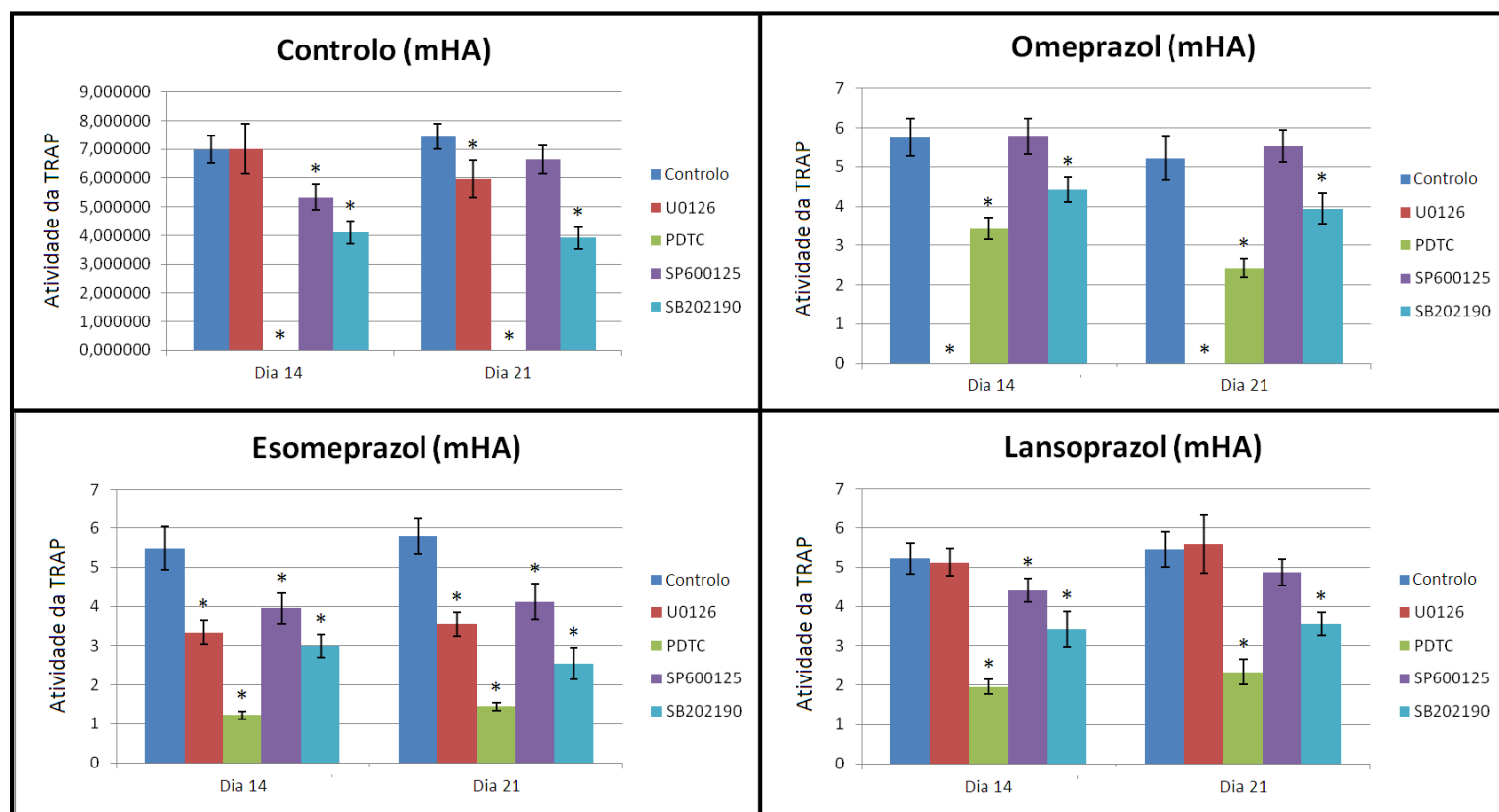


Figura 30 - Quantificação da atividade da TRAP nas culturas de PBMC na superfície de pastilhas mHA, tratadas com diferentes IBP na concentração de  $10^{-6}$  M, na presença ou ausência de diferentes inibidores das vias de sinalização. \* Significativamente diferente do controlo.

Ao 21º dia, nas culturas de controlo em mHA, o U0126 promoveu um efeito inibitório de ~20%. Esta inibição foi mais expressiva com esomeprazol (~39%), e total quando administrado omeprazol (~100%). No entanto, na presença de lansoprazol, a atividade da TRAP não foi significativamente alterada. O PDTC originou um efeito inibitório completo (~100%) na ausência de IBP. Esta inibição foi apenas parcial na presença de omeprazol (~54%), esomeprazol (~75%) e lansoprazol (~57%). O SP600125 não afetou a atividade da TRAP de um modo significativo na ausência de IBP, nem na presença de omeprazol e lansoprazol, mantendo-se a inibição moderada após suplementação com esomeprazol (~29%). Nas culturas de controlo, o SB202190 causou uma inibição de ~48%, sendo o efeito menor com a utilização de omeprazol (~25%) e lansoprazol (~35%), e maior com a utilização de esomeprazol (~56%) (Figura 30).

## Caracterização da capacidade de reabsorção de HA

De modo a determinar a atividade de reabsorção de HA nas diferentes condições experimentais testadas, foi quantificada a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  no meio de cultura. As PBMC foram mantidas na ausência e presença de omeprazol, esomeprazol e lansoprazol, sendo utilizada a menor concentração de cada IBP que causou um efeito significativo no comportamento osteoclástico ( $10^{-6}$  M). Os resultados apresentados correspondem aos valores obtidos para cada condição experimental, normalizados com o valor de  $\text{Ca}^{2+}$  libertado no meio de cultura pelas pastilhas de HA na ausência de células (Figura 31).

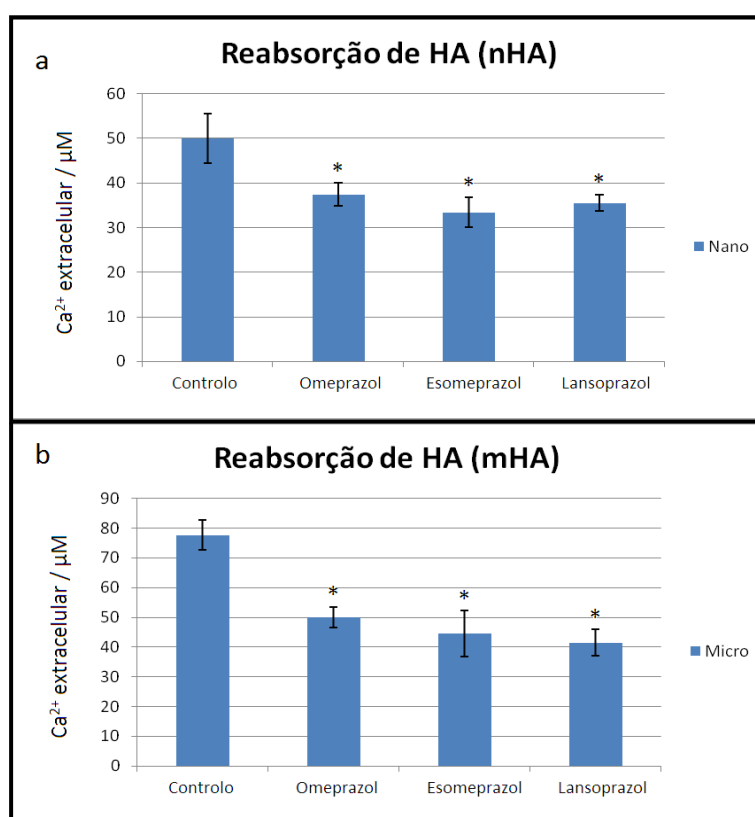


Figura 31 - Quantificação do  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular em  $\mu\text{M}$  nas pastilhas de nHA (a) e mHA (b). \* Significativamente diferente do controlo.

A presença de IBP provocou, em ambos os tipos de HA, uma redução da quantidade de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular. Na nHA, a inibição causada pelos três IBP foi semelhante, sendo, no entanto, o maior efeito provocado pelo esomeprazol (~33%), seguido pelo lansoprazol (~29%) e, finalmente, pelo omeprazol (~25%) (Figura 31a). Na superfície microestruturada, os IBP produziram um efeito ligeiramente mais acentuado, com a maior inibição originada pelo lansoprazol (~47%), seguido pelo esomeprazol (~43%) e omeprazol (~35%) (Figura 31b).

## Visualização das culturas celulares por Microscopia Eletrônica de Varrimento

Ao 21º dia, as culturas celulares foram observadas através de microscopia eletrônica de varrimento. Os respectivos resultados encontram-se na Figura 32.

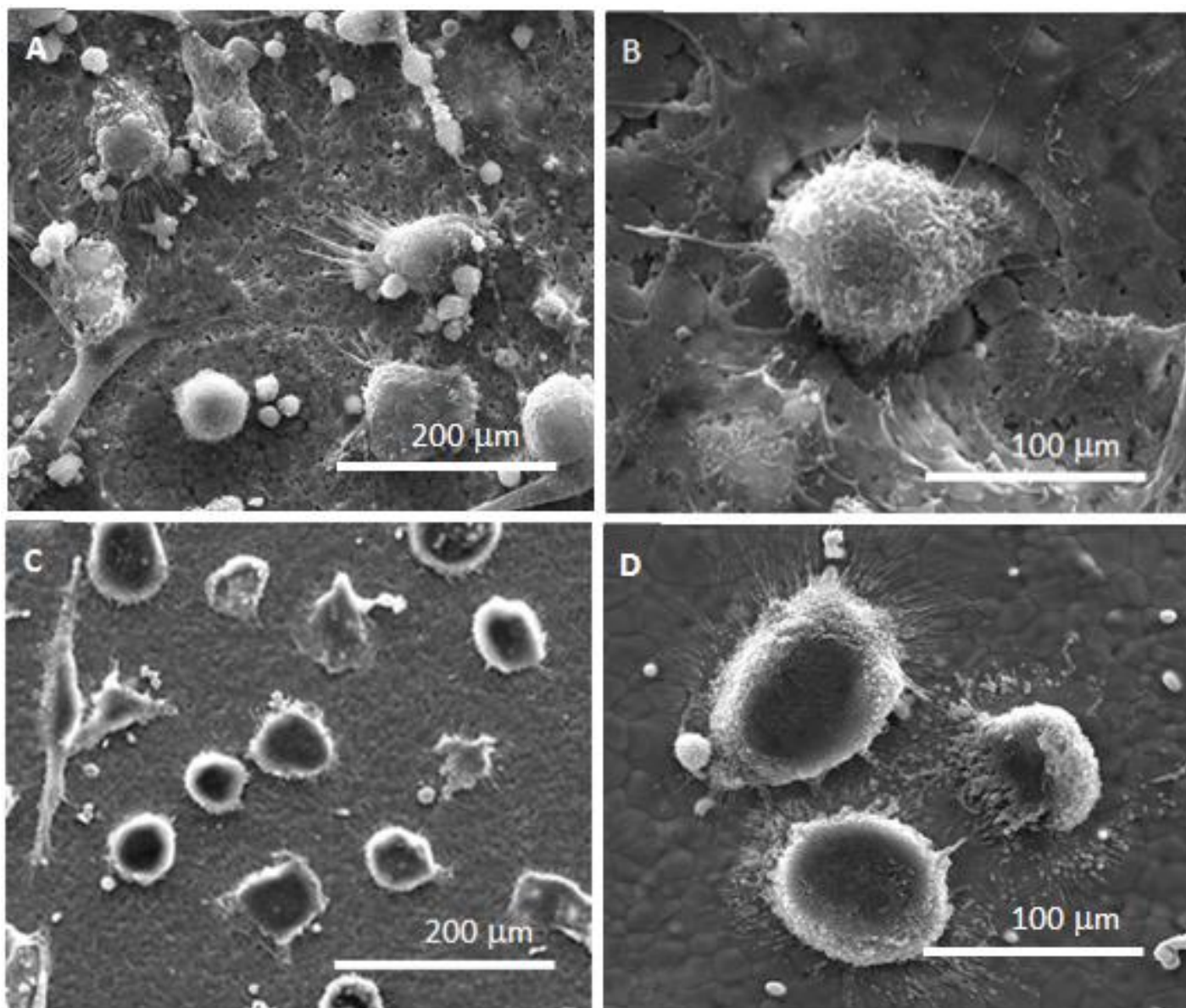


Figura 32 - Análise por Microscopia Eletrônica de Varrimento das culturas celulares tratadas com omeprazol. É possível observar os osteoclastos na superfície das pastilhas de HA nano (A, B) e microestruturadas (C, D), e a respectivas lacunas na nHA (C) e mHA (D).

As culturas celulares demonstraram, na presença e ausência de IBP, uma distribuição de osteoclastos homogênea nas superfícies de nHA e mHA. Verificou-se que a morfologia celular foi afetada pelas características da superfície de HA, tendo-se observado uma conformação celular mais esférica sobre a área microestruturada.

## Visualização das culturas celulares por Microscopia Ótica Confocal

### Visualização de células com anéis de actina e expressão de VNR e CTR

Após marcação, as células foram observadas por microscopia ótica confocal, ao 21º dia, de modo a verificar a existência de características osteoclásticas, em particular, anéis de actina e expressão de VNR e CTR (Figura 33).

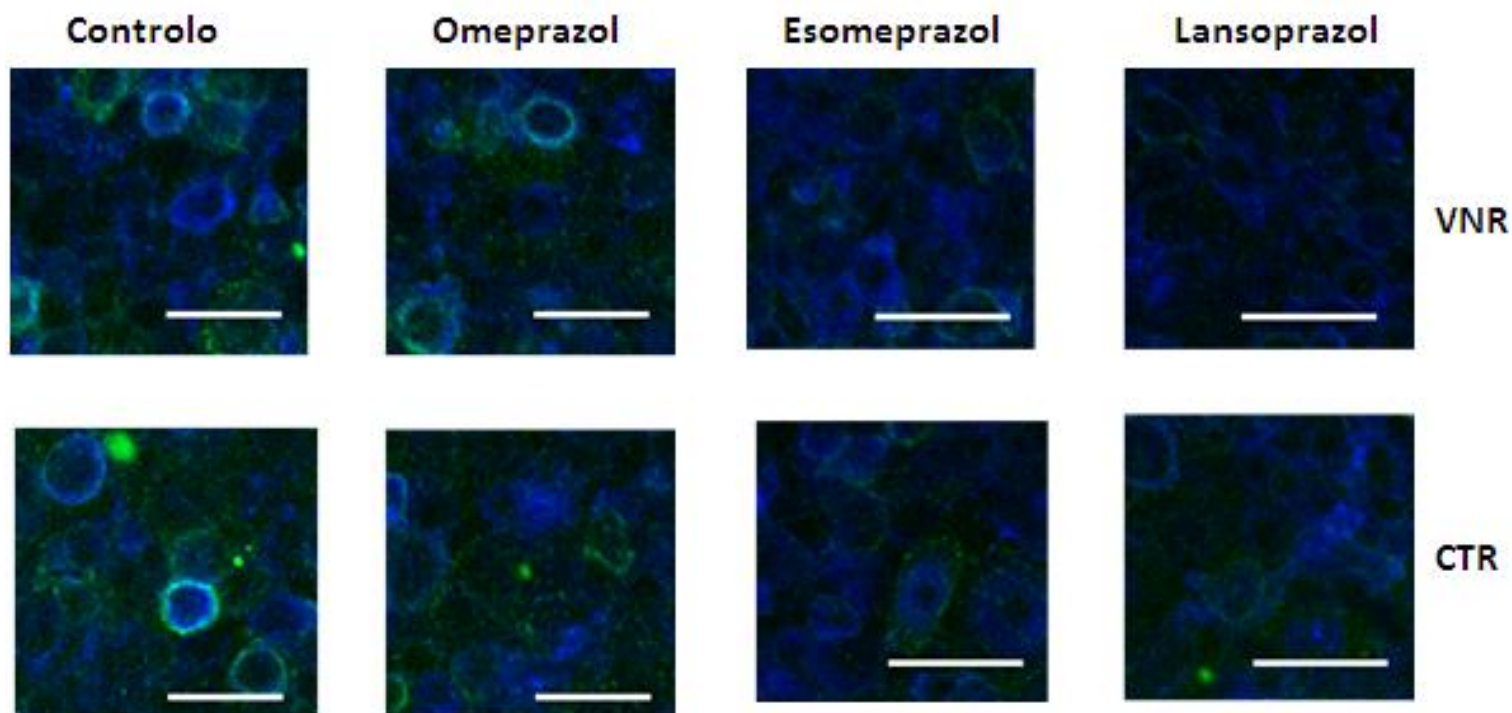


Figura 33 - Observação, ao 21º dia, através de microscopia ótica confocal, das culturas de PBMC efetuadas na superfície de HA na presença de M-CSF e RANKL, e na ausência (controlo) ou presença de diferentes IBP. São demonstrados os osteoclastos com uma coloração azul para a actina, e uma coloração verde para os recetores da vitronectina (VNR) ou recetores da calcitonina (CTR). As barras brancas representam 120 µm.

Na ausência de IBP, as culturas de PBMC realizadas em ambas as superfícies de HA, demonstraram um número elevado de células com marcação positiva para a actina e para o VNR e CTR. Por outro lado, verificou-se que, na presença destes fármacos, o número de células osteoclásticas diminuiu significativamente.

## Discussão

O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de aprofundar o estudo do perfil osteoclastogénico dos IBP em superfícies de HA micro e nanoestruturadas, nomeadamente o omeprazol, esomeprazol e lansoprazol. Para tal, foram isolados, e semeados nas referidas superfícies, precursores osteoclásticos provenientes de sangue periférico humano, os quais foram mantidos na presença dos fatores osteoclastogénicos M-CSF e RANKL e, posteriormente, suplementados com IBP.

O estudo da interação entre as células osteoclásticas e a superfície de implantes ósseos possui uma grande relevância, pois a maioria dos materiais utilizados na substituição/regeneração óssea requer que ocorra o processo de reabsorção osteoclástica na área de contacto com os tecidos, de modo a desempenhar corretamente as suas funções. Existe, também, um enorme potencial de aplicação de IBP neste contexto. No entanto, atualmente, a informação relativa aos efeitos destes fármacos sobre os processos osteoclastogénicos é contraditória, pelo que existe a necessidade de investigar com maior detalhe este tema.

Os IBP encontram-se entre os fármacos mais prescritos do mundo, sendo principalmente usados na terapia de problemas relacionados com o excesso de ácido gástrico.<sup>[187]</sup> Por serem bases fracas, possuem a capacidade de atravessar a membrana das células parietais, cujo interior consiste num meio extremamente ácido.<sup>[134]</sup> Aqui, convertem-se na sua forma ativa, inibindo a atividade da bomba de prótons gástrica, responsável pela segregação ácida<sup>[154][139]</sup>, e possibilitando o tratamento de doenças como a esofagite e úlceras, entre outras.<sup>[133]</sup> Uma vez que o mecanismo de atuação dos osteoclastos requer, do mesmo modo, o envolvimento de uma bomba de prótons (vacuolar), que promove a acidificação e degradação do tecido ósseo, os IBP surgem como potenciais moduladores da atividade osteoclástica.

Os estudos mais recentes apontam, porém, no sentido de existirem consequências adversas decorrentes da terapêutica com base nestes fármacos, incluindo um risco aumentado de fraturas ósseas.<sup>[144][186][189][190]</sup> Assim, foi demonstrado que os tratamentos com IBP podem, quando realizados por períodos prolongados, causar uma absorção deficiente de cálcio.<sup>[196-199]</sup> A absorção deste mineral depende da existência de um meio ácido, pelo que este tipo de terapia causa um desequilíbrio na sua assimilação, resultando numa maior taxa de perda óssea.<sup>[188][146]</sup> O uso prolongado destes fármacos conduz também a um decréscimo da reabsorção de vitamina B<sub>12</sub>, o que pode originar um baixa densidade mineral e, consequentemente, fraturas.<sup>[191]</sup>

Outros estudos apontam, contudo, no sentido contrário, não relacionando o uso de IBP com uma redução significativa da densidade mineral<sup>[200]</sup>, nem associando estas moléculas a uma absorção de cálcio deficiente.<sup>[201][202]</sup> Alguns destes, efetuados *in vitro* e *in vivo*, sugerem mesmo que os IBP podem causar um aumento da densidade óssea, devido ao seu efeito de diminuição da reabsorção óssea, pelo bloqueio da bomba de prótons osteoclástica.<sup>[186][192-194]</sup> Pensa-se ainda que o aumento do pH gástrico, decorrente da administração oral destes fármacos, pode originar hipergastrinemia, seguindo-se um estado de hiperparatiroidismo, que conduz a um maior *turnover* ósseo.<sup>[203]</sup>



A utilização de biomateriais permitiu a substituição dos enxertos autólogos e alogénicos, cuja utilização provocava várias complicações<sup>[52][53]</sup>, e tornou possível a mimetização da estrutura tridimensional do tecido ósseo, apresentando um meio de proliferação celular mais eficiente.<sup>[54]</sup> Deste modo, existe atualmente uma perspetiva mais favorável de regeneração óssea, associada a tratamentos mais efetivos, através da libertação local de fármacos.<sup>[50]</sup>

A osteointegração acontece com a ligação dos biomateriais ao osso, através da síntese de tecido ósseo na interface entre ambos.<sup>[70]</sup> Este processo depende das propriedades de osteoindução e osteocondução do biomaterial utilizado<sup>[73]</sup>, e pode ser acelerado através do revestimento do implante com HA.<sup>[75]</sup> O sucesso da regeneração óssea está dependente, no entanto, não só da existência de osteointegração e osteossíntese, como também do processo de vascularização e reabsorção óssea.<sup>[51]</sup>

A HA não só revela propriedades osteoindutivas e osteocondutoras<sup>[82][83]</sup>, como é completamente biocompatível<sup>[84]</sup>, devido à sua semelhança estrutural com a componente inorgânica da matriz óssea, pelo que a síntese deste mineral manifesta uma grande relevância no que concerne a regeneração óssea.<sup>[78][79]</sup> Contudo, apresenta uma reduzida resistência à fratura, o que causa restrições na sua aplicação.<sup>[89]</sup> Além disso, devido à similaridade com o osso, possui uma baixa taxa de biodegradação<sup>[90][91]</sup>, que leva à sua permanência no organismo por períodos de tempo demasiadamente longos, o que geralmente não é pretendido.<sup>[94][95]</sup>

Para o sucesso dos processos relacionados com a regeneração óssea, é aconselhável a utilização de biomateriais que permitam uma rápida e eficiente formação de tecido ósseo na sua superfície e, se necessário, no seu interior. A HA nanoestruturada apresenta uma constituição porosa que fornece uma maior biocompatibilidade e osteocondução que a microHA, devido à sua estrutura altamente interligada.<sup>[113]</sup> Considerando também o facto de as moléculas orgânicas interagirem a uma escala nanométrica, a nHA demonstra um maior potencial de aplicabilidade<sup>[118]</sup>, pois permite reações moleculares mais céleres, e um maior controlo sobre as interações proteicas e respostas celulares.<sup>[119]</sup> Além disso, da sua maior área de superfície, advém uma resistência a fraturas superior.<sup>[120]</sup>

Por conseguinte, a conceção de uma superfície de HA que permita o controlo da taxa de degradação óssea pelos osteoclastos, possibilitará também a regulação da resposta celular na sua superfície, bem como a administração de agentes terapêuticos. Este cenário é possível através do controlo da rugosidade e complexidade da superfície de HA, amplificando o seu potencial osteogénico, de modo a produzir implantes mais eficientes.<sup>[195]</sup>

No presente trabalho, foi utilizada a técnica de Microscopia Eletrónica de Varrimento, de modo a efetuar a observação da topografia das pastilhas de hidroxiapatite micro e nanoestruturada. Através da avaliação do diâmetro médio dos grãos de HA, foram observadas diferenças significativas entre ambas as superfícies testadas ( $\varnothing_{nHA} = 70\text{nm}$  e  $\varnothing_{mHA} = 3,9\mu\text{m}$ ).

As culturas celulares foram mantidas na presença dos fatores osteoclastogénicos M-CSF e RANKL, que desempenham um papel fundamental na proliferação e diferenciação dos progenitores osteoclastogénicos.<sup>[1][14]</sup> Pensa-se que este processo seja

mais evidente na superfície de pastilhas de HA microestruturada, tendo sido referida uma proporcionalidade entre a dimensão do grão de HA e a taxa de osteoclastogénese.<sup>[204]</sup> Os resultados obtidos neste estudo, relativamente à quantificação de ADN, atividade da TRAP, e capacidade de reabsorção de HA, em diferentes condições experimentais, na superfície de mHA e nHA, vão ao encontro desta ideia, ou seja, verificou-se que as culturas de PBMC, efetuadas em mHA, exibiram uma taxa superior de adesão celular e diferenciação osteoclástica, relativamente à nHA.

Recentemente, foi demonstrado que a atividade da TRAP atingiu valores superiores em superfícies nanoestruturadas, em comparação com as microestruturadas, tendo, inclusivamente, a observação por MEV revelado a presença de lacunas de reabsorção apenas nesse tipo de superfície.<sup>[195]</sup> O referido estudo usou, porém, osteoclastos diretamente isolados de ossos longos de coelhos recém-nascidos, e a área utilizada baseava-se em dentina isolada a partir de marfim de elefante, sendo por isso diferentes dos elementos utilizados no presente estudo. Outros autores referem a obtenção de uma maior taxa de reabsorção em nHA, e um grande estímulo da diferenciação de células osteoclásticas nessa superfície, mas esta condição só foi obtida após uma profunda redução do seu conteúdo de carbonato.<sup>[205]</sup>

Assim, existe uma relação direta entre as características físico-químicas de um biomaterial e o comportamento celular, em particular, o comportamento osteoclástico. Consequentemente, surge a possibilidade de projeção de superfícies de HA capazes de induzir taxas ótimas de formação e degradação óssea, especificamente desenhadas para diferentes aplicações no contexto ósseo.

O efeito causado, no presente estudo, pelos IBP nas células osteoclásticas aparentou ser dependente da dose administrada.<sup>[206]</sup> Foram utilizadas, de modo a abranger uma grande gama, as concentrações de  $10^{-7}$  M e  $10^{-4}$  M, nas quais se incluem as máximas concentrações plasmáticas obtidas durante uma terapia com IBP. É de realçar que estes valores fornecem apenas informação sobre a concentração da forma inalterada dos IBP na corrente sanguínea, não sendo conhecidas as concentrações das suas formas modificadas pelo baixo pH, principalmente, no tecido ósseo.

Além disso, o processo de difusão dos IBP no tecido ósseo é ainda apenas parcialmente conhecido, não sendo possível determinar se ocorreu a conversão do fármaco na sua forma ativa, ou se esta teve lugar em localizações específicas.<sup>[182][207]</sup> Existem também vários estudos *in vitro*, realizados a um pH neutro, nos quais não foi demonstrada a formação do composto ativo dos IBP, o que levanta a hipótese de estes afetarem as células ósseas na sua forma original.<sup>[208-210]</sup>

Observou-se que, conforme esperado<sup>[203]</sup>, as PBMC se diferenciaram em osteoclastos, após exposição aos fatores osteoclastogénicos M-CSF e RANKL, estando estes resultados em concordância com estudos realizados através do mesmo sistema de cultura.<sup>[211]</sup> A presença de células osteoclásticas funcionais foi confirmada pela expressão de diversos genes osteoclásticos, pela atividade da TRAP e pela capacidade de reabsorção de HA.

Foi verificado um decréscimo na densidade e diferenciação celular, provocado pelos IBP, de acordo com a dose administrada, principalmente com concentrações iguais ou superiores a  $10^{-6}$  M, um valor aproximado da máxima concentração



plasmática ( $C_{\max}$ ) descrita para os IBP.<sup>[212][213]</sup> A diminuição na densidade osteoclástica foi ratificada pelo aumento da taxa de apoptose, atingindo os 15% para as nHA e os 25% para as mHA. Relativamente à diferenciação celular, foi registada uma redução até 25% para as nHA e até 30% para as mHA.

Quantificou-se, também, a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular nas culturas, com o objetivo de avaliar a taxa de reabsorção nas diferentes condições experimentais, concluindo-se que os resultados foram ainda mais expressivos, ou seja, a concentração de  $10^{-6}$  M causou uma inibição da reabsorção osteoclástica compreendida entre 25 e 33% em nanoHA, e entre 35 e 47% em microHA. Em ambas as superfícies, os valores de inibição obtidos para cada um dos três fármacos administrados foram aproximados entre si. Porém, na mHA, principalmente na presença de lansoprazol, a percentagem de inibição da reabsorção foi superior relativamente ao controlo.

Assim, verificou-se que o comportamento osteoclástico foi diretamente influenciado pela superfície de HA utilizada, registando-se uma taxa de diferenciação superior na superfície das pastilhas de HA microestruturada. Foi também demonstrado, em ambas as superfícies, que a osteoclastogénese é amplamente afetada pelos IBP, tendo o omeprazol causado o efeito mais evidente a este nível, tanto na presença de mHA, como nHA.

Estes dados demonstram que os IBP bloqueiam, de facto, a reabsorção osteoclástica, sendo mais efetivos na superfície microestruturada. A razão mais plausível para este acontecimento tem que ver com a sua capacidade de inibição da bomba de prótons osteoclástica.<sup>[181][214]</sup> Foi estudada, *in vivo*, a influência dos IBP na atividade osteoclástica, sendo observada, em humanos, uma alteração dos marcadores de reabsorção óssea na urina<sup>[194]</sup> e, em animais, uma inibição da reabsorção osteoclástica de implantes à base de fosfato de cálcio.<sup>[182]</sup> Deste modo, conclui-se que os IBP afetam, de forma mais acentuada, a função celular do que a proliferação. Este facto relaciona-se com uma possível indução, por parte destes fármacos, de uma citotoxicidade direta não específica, que é posteriormente amplificada pelos efeitos inibitórios específicos em determinados parâmetros funcionais, tais como a reabsorção osteoclástica.<sup>[206][210]</sup>

A diferenciação e a atividade osteoclástica envolvem várias vias de sinalização intracelulares, que utilizam diferentes mediadores, bem como complexos mecanismos de modulação simples e cruzada, permitindo aos osteoclastos o desempenho preciso das suas funções.<sup>[215]</sup> No presente estudo, procedeu-se à avaliação, em ambas as superfícies de HA, do impacto dos IBP nas vias de sinalização referidas, através da quantificação da atividade da TRAP, e da quantidade total de ADN. De acordo com os resultados obtidos, verificou-se que estes fármacos provocaram, de facto, alterações no envolvimento de algumas das vias testadas.

Apesar da existência de estudos que referem uma redução da osteoclastogénese após o bloqueio da via MEK<sup>[216]</sup>, foi demonstrado que o U0126, o inibidor da mesma via de sinalização utilizado neste estudo, induziu um aumento da diferenciação osteoclástica, ou seja, esta via aparentou regular negativamente a osteoclastogénese, tal como proposto por outros autores.<sup>[217][218]</sup>

Na ausência de IBP, nas culturas realizadas sobre nHA, a via MEK demonstrou ser parcialmente importante para a osteoclastogénese, tendo-se verificado uma situação semelhante na presença de lansoprazol. No entanto, na presença de omeprazol e esomeprazol, esta via revelou-se menos relevante para o desenvolvimento osteoclástico. Na mHA, nas culturas de controlo e na presença de esomeprazol, a via de sinalização considerada revelou uma baixa importância na osteoclastogénese e, na presença de lansoprazol, não foi demonstrada qualquer inibição. Por outro lado, com a administração do omeprazol, a inibição da atividade osteoclástica foi total, o que revela uma grande relevância da via MEK na presença deste fármaco.

O NF-κB é um fator de transcrição essencial para que os precursores osteoclásticos se diferenciem em osteoclastos. Assim, os seus inibidores previnem a formação osteoclástica, induzida direta ou indiretamente por RANKL ou TNF.<sup>[171]</sup> Os resultados relativos à superfície nanoestruturada parecem mostrar que, na ausência de IBP, e na presença de omeprazol e lansoprazol, a via NF-κB possui uma grande importância na osteoclastogénese, tendo, apenas na presença de esomeprazol, demonstrado uma importância parcial. Nas culturas de controlo efetuadas em mHA, o efeito inibitório foi total, o que demonstra a ampla relevância desta via na ausência de IBP e neste tipo de superfície. Na presença de esomeprazol, a inibição foi inferior, continuando, no entanto, a ser relevante. Por outro lado, este efeito foi apenas parcial com a administração de omeprazol e lansoprazol, significando que a via NF-κB não possui a mesma importância sob essas condições.

A via JNK influencia positivamente a osteoclastogénese, tendo sido demonstrado que a inativação do JNK1, uma enzima envolvida na diferenciação e proliferação celular, leva a uma diminuição da diferenciação osteoclástica *in vitro*.<sup>[219]</sup> Nas culturas em que os IBP não foram utilizados, esta via revelou, relativamente à nanoHA, uma elevada importância, pois foi causado um grande efeito de inibição na osteoclastogénese. Por outro lado, na presença dos três IBP, a sua relevância foi menor. No caso da mHA, foi também demonstrada uma baixa importância da via JNK nas culturas de controlo, pois o efeito inibitório demonstrou ser fraco, o que também se verificou na presença de esomeprazol e lansoprazol. Por sua vez, a administração de omeprazol não registou qualquer inibição da atividade osteoclástica.

A via p38 MAPK é também responsável pela regulação positiva da osteoclastogénese.<sup>[217]</sup> Na nHA, o bloqueio da formação osteoclástica foi parcial nas culturas de controlo e na presença de esomeprazol, pelo que a via considerada possui uma importância moderada nessas condições. No caso do omeprazol e lansoprazol, a sua influência foi ainda mais baixa. Nas culturas efetuadas em microHA, e mantidas na ausência de IBP e presença de esomeprazol, esta via de sinalização foi razoavelmente importante. Contudo, com a administração de omeprazol e lansoprazol, a via p38 MAPK foi ainda menos relevante na osteoclastogénese.

Assim, as modulações observadas indicam que os mecanismos intracelulares envolvidos na osteoclastogénese são, de facto, afetados pela administração de IBP, sendo, presumivelmente, as distintas estruturas químicas destes fármacos responsáveis pela variedade de efeitos observados. Neste estudo, foi demonstrado que, de acordo com a dose administrada, e a superfície de HA utilizada, os IBP provocam um efeito

inibitório no comportamento osteoclástico, a concentrações similares aos níveis atingidos no plasma com doses terapêuticas, sendo este efeito mais acentuado no processo de reabsorção osteoclástica do que na proliferação celular. Qualitativa e quantitativamente, os efeitos causados pelo omeprazol, esomeprazol, e lansoprazol, foram similares, tendo apenas sido observadas divergências nas vias de sinalização intracelulares.

Esta observação é dotada de particular interesse, especialmente se for desejada a aplicação destes fármacos, em conjunto com biomateriais de HA, na área da regeneração óssea, pois a recuperação do tecido afetado pode ser prejudicada na eventualidade de uma excessiva atividade osteoclástica na superfície do biomaterial implantado.<sup>[215]</sup> Este cenário pode, adicionalmente, ser favorável em casos de doenças associadas a uma alta taxa de reabsorção óssea.<sup>[47]</sup> Assim, a modulação do comportamento osteoclástico, através da aplicação de IBP em implantes de HA, revela-se como um recurso valioso na aproximação a um conceito de regeneração óssea mais eficaz.

## Conclusão

Foi observado, no presente estudo, que as culturas de PBMC realizadas em microHA obtiveram uma taxa superior de adesão celular e diferenciação osteoclástica, comparativamente com as culturas em HA nanoestruturada.

Os IBP causaram, em função da dose administrada, uma redução na densidade, diferenciação e, particularmente, atividade de reabsorção osteoclástica, sendo este efeito mais significativo a partir da concentração de  $10^{-6}$  M. Além disso, a ação destes fármacos foi também mais evidente na superfície das pastilhas de mHA.

Estes dados demonstram que a superfície escolhida exerce uma influência direta no comportamento osteoclástico, e que os IBP bloqueiam o processo de reabsorção mais efetivamente em áreas microestruturadas, tendo-se constatado que o efeito mais expressivo foi fomentado pelo omeprazol.

Do mesmo modo, os resultados relativos ao impacto dos IBP nas vias de sinalização intracelulares envolvidas nos processos osteoclásticos demonstraram que, em ambas as superfícies, foi sentida a ação destes fármacos, sendo os efeitos obtidos com concentrações semelhantes aos níveis plasmáticos atingidos com doses terapêuticas.

As propriedades dos biomateriais, e a influência que estas exercem no comportamento osteoclástico, bem como a modulação farmacológica destas células, são aspectos fundamentais para o desenvolvimento de implantes à base de HA, capazes de controlar a formação e degradação óssea, e que poderão desempenhar um papel fundamental no futuro da medicina regenerativa óssea.

## Referências

- [1] Datta HK, Ng WF, Walker JA, Tuck and SP, Varanasi SS. The cell biology of bone metabolism. *J. Clin. Pathol.* 2008; 61:577-587.
- [2] Steele DG, Bramblett CA. The Anatomy and Biology of the Human Skeleton. *Texas A&M University Press 7<sup>th</sup> edition.* 1988.
- [3] Ganong WF. Review of Medical Physiology. *Lange Medical Publishing Company.* 1983.
- [4] Kaplan FS, Hayes WC, Keaveny TM, Boskey A, Einhorn TA, Iannotti JP. Form and function of bone. Orthopaedic Basic Science. American Academy of Orthopaedic Surgeons, Rosemont, pp. 127–184. 1994.
- [5] Weiner S, Traub W, Wagner HD. Lamellar bone: structure-function relations. *J Struct Biol.* 1999; 126:241–255.
- [6] Carmejane O, Morris MD, Davis MK, Stixrude L, Tecklenburg M, Rajachar RM, Kohn DH. 2005. Bone Chemical Structure Response to Mechanical Stress Studied by High Pressure Raman Spectroscopy.
- [7] Junqueira LC, Carneiro J. Tecido ósseo. Histologia básica. pp. 111-128. 2004.
- [8] Sodek J, McKee ME. 2000. Molecular and cellular biology of alveolar bone. *Periodontology* 2000; 24:99-126.
- [9] Urist MR, Huo YK, Brownell AG, Hohl WM, Buyske J, Lietze A, *et al.* Purification of bovine bone morphogenetic protein by hydroxyapatite chromatography. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1984; 81: 371-475.
- [10] Dimitriou R, Gionnoudis PV. Discovery and development of BMPs. *Int J Care Injured.* 2005; 36S:S28-S33.
- [11] Andia DC, Cerri PS, Spolidorio LC. 2006. Tecido ósseo: aspectos morfológicos e histofisiológicos.
- [12] Ortner DJ, Putschar W. 1981. Identification of Pathological Conditions in Human Skeletal Remains.
- [13] Teitelbaum SL. Bone Resorption by Osteoclasts. *Science.* 2000; 289:5484.1504.
- [14] Väänänen HK, Laitala-Leinonen T. 2008. Osteoclast lineage and function.

- [15] Blair HC, Teitelbaum SL, Ghiselli R, Gluck S. Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump. *Science* 1989; 245. 855.
- [16] Abu-Amer Y, Ross FP, Schlesinger P, Tondravi MM, Teitelbaum SL. 1997. Substrate recognition by osteoclast precursors induces C-src/microtubule association.
- [17] Silver IA, Murrills RJ, Etherington DJ. 1988. Microelectrode studies on the acid microenvironment beneath adherent macrophages and osteoclasts.
- [18] Vaananen HK, Horton M. 1995. The osteoclast clear zone is a specialized cell-extracellular matrix adhesion structure.
- [19] Engleman VW *et al.* 1997. A peptidomimetic antagonist of the  $\alpha v \beta 3$  integrin inhibits bone resorption in vitro and prevents osteoporosis in vivo.
- [20] Duong LT *et al.* 1998. PYK2 in osteoclasts is an adhesion kinase, localized in the sealing zone, activated by ligation of  $\alpha v \beta 3$  and phosphorylated by src kinase.
- [21] Chellaiah M *et al.* 2000. Gelsolin deficiency blocks podosome assembly and produces increased bone mass and strength.
- [22] Marchisio PC *et al.* 1984. Cell-substratum interaction of cultured avian osteoclasts is mediated by specific adhesion structures.
- [23] Blair HC, Kahn AJ, Crouch EC, Jeffrey JJ, Teitelbaum S. 1986. Isolated osteoclasts resorb the organic and inorganic components of bone.
- [24] Fallon MD, in: Conn CV, Fujita JR, Potts JR, *et al.* Endocrine Control of Bone and Calcium Metabolism, *Elsevier North Holland, Amsterdam* pp. 144–146. 1984.
- [25] Baron R, Neff L, Louvard D, Courtov PJ. 1985. Cell mediated extracellular acidification and bone resorption: Evidence for a low pH in resorbing lacunae and localization of 100kD lysosomal protein at the osteoclast ruffled border.
- [26] Blair H, Schlesinger PH. 1990. Purification of a stilbene sensitive chloride channel and reconstitution of chloride conductivity into phospholipids vesicles.
- [27] Väänänen HK, Karhukorpi EK, Sundquist K, Wallmark B, Roininen I, Hentunen T, Tuukkanen J, Lakkakorpi P. 1990. Evidence for the presence of a proton pump of the vacuolar H(+)-ATPase type in the ruffled borders of osteoclasts.
- [28] Bekker BJ, Gay CV. 1990. Biochemical characterization of an electrogenic vacuolar proton pump in purified chicken osteoclast plasma membrane vesicles.

- [29] Sundquist K, Lakkakorpi P, Wallmark B, Väänänen K. 1990. Inhibition of osteoclast proton transport by bafilomycin A1 abolishes bone resorption.
- [30] Kornak U, Kasper D, Bosl MR, Kaiser E, Schweizer M, Schulz A, Friedrich W, Delling G, Jentsch TJ. 2001. Loss of the ClC-7 chloride channel leads to osteopetrosis in mice and man.
- [31] Riihonen R, Seppänen A, Nielsen S, Väänänen HK, Laitala-Leinonen T, Kwon TH, unpublished
- [32] Everts V, Korper W, Hoeben KA, Jansen ID, Bromme D, Cleutjens KB, Heeneman S, Peters C, Reinheckel T, Saftig P, Beertsen W. 2006. Osteoclastic bone degradation and the role of different cysteine proteinases and matrix metalloproteinases: differences between calvaria and long bone.
- [33] Troen BR. 2006. The regulation of Cathepsin K gene expression
- [34] Bossard MJ, Tomaszek TA, Thompson SK, Amegadzie BY, Hanning CR, Jones C, Kurdyla JT, McNulty DE, Drake FH, Gowen M, Levy MA. 1996. Proteolytic activity of human osteoclast cathepsin K. Expression, purification, activation, and substrate identification.
- [35] Votta BJ, Levy MA, Badger A, Bradbeer J, Dodds RA, James IE, Thompson S, Bossard MJ, Carr T, Connor JR, Tomaszek TA, Szewczuk L, Drake FH, Veber DF, Gowen M. 1997. Peptide aldehyde inhibitors of cathepsin K inhibit bone resorption both in vitro and in vivo.
- [36] Nesbitt SA, Horton MA. 1997. Trafficking of matrix collagens through bone-resorbing osteoclasts
- [37] Parikka V, Lehenkari P *et al.* 2001. Estrogen reduces the depth of resorption pits by disturbing the organic bone matrix degradation activity of mature osteoclasts.
- [38] Behonick DJ, Xing Z, Lieu S, Buckley JM, Lotz JC, Marcucio RS, Werb Z, Mielau T, Colnot C. 2007. Role of matrix metalloproteinase 13 in both endochondral and intramembranous ossification during skeletal regeneration.
- [39] Hughes DE *et al.* 1996. Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF- $\beta$ .
- [40] Sunyer T, Lewis J, Collin-Osdoby P. 1999. Estrogen inhibits interleukin-1 response of human marrow-derived osteoclast-like cells by modulating isoforms of IL-1 receptor expression.

- [41] Udagawa N *et al.* 1990. Origin of osteoclasts: Mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells.
- [42] Kong YY *et al.* 1999. Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand.
- [43] Lacey DL *et al.* 1998. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation.
- [44] Hofbauer LC *et al.* 1999. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cell: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis.
- [45] Lee SK, Lorenzo JA. 1999. Parathyroid hormone stimulates TRANCE and inhibits osteoprotegerin messenger ribonucleic acid expression in murine bone marrow cultures: correlation with osteoclast-like cell formation.
- [46] Kitazawa R, Kitazawa S, Maeda S. 1999. Promoter structure of mouse RANKL/TRANCE/OPGL/ODF gene.
- [47] Rodan GA, Martin TJ. 2000. Therapeutic approaches to bone diseases.
- [48] Abu-Amer Y, Ross FP, Edwards J, Teitelbaum SL. 1997. Lipopolysaccharide-stimulated osteoclastogenesis is mediated by tumor necrosis factor via its P55 receptor.
- [49] Kimble RB *et al.* 1996. Estrogen deficiency increases the ability of stromal cells to support murine osteoclastogenesis via an interleukin-1 and tumor necrosis factor-mediated stimulation of macrophage colony-stimulating factor production.
- [50] Matassi F, Nistri L, Paez DC, Innocenti M. 2011. New biomaterials for bone regeneration.
- [51] Giannoudis PV, Einhorn TA, Marsh D. 2007. Fracture healing: the diamond concept.
- [52] Finkemeier CG. Current concept review: Bone-grafting and bone-graft substitutes. *J Bone Joint Surg Am.* 2002; 84:454–64.
- [53] Keating JF, McQueen MM. Substitutes for autologous bone graft in orthopaedic trauma. *J Bone Joint Surg Br.* 2001; 83:3–8.



- [54] Kelly CM, Wilkins RM, Gitelis S, Hartjen C, Watson JT, Kim PT. The use of a surgical grade calcium sulfate as a bone graft substitute: results of a multicenter trial. *Clin Orthop Relat Res.* 2001; 382:42–50.
- [55] Brach del Prever EM, Donati DM, Fiorentino S, Macrì E. Regulatory aspects of regenerative medicine products and informed consent. *GIOT.* 36 pp. 223–242. 2010.
- [56] Urist MR, Silverman BF, Buring K, et al. The bone induction principle. *Clin Orthop.* 1967; 53:243–83.
- [57] Drosos GI, Kazakos KI, Kouzoumpasis P, Verrettas DA. Safety and efficacy of commercially available demineralised bone matrix preparations: A critical review of clinical studies. *Injury.* 2007;38(Suppl4):S13–S21.
- [58] Horowitz MC, Friedlaender GE, Qian HY. The immune response: the efferent arm. *Clin Orthop Relat Res.* 1996; 326:25–34.
- [59] Schmidmaier G, Schwabe P, Strobel C, Wildemann B. Carrier systems and application of growth factors in orthopaedics. *Injury Int. J. Care Injured.* 2008; 39(Suppl2):S37–S43.
- [60] Martin I, Riboldi SA, Jakob M, Wendt D. SnapShot: Bioreactors systems in tissue engineering (TE) & regenerative medicine (RM). *Biomaterials.* 2010 Apr;31((11)):3114–5.
- [61] Vögelin E, Jones NF, Huang JI, Brekke JH, Lieberman JR. Healing of a critical sized defect in the rat femur with use of a vascularized periosteal flap, a biodegradable matrix, and bone morphogenetic protein. *J Bone Joint Surg Am.* 2005; 87:1323–31.
- [62] Burkoth AK, Burdick J, Anseth KS. Surface and bulk modifications to Photocrosslinked polyanhydrides to control degradation behavior. *J Biomed Mater Res.* 2000; 51:352–9.
- [63] Lee KW, Wang S, Lu L, Jabbari E, Currier BL, Yaszemski MJ. Fabrication and characterization of poly(propylene fumarate) scaffolds with controlled pore structures using 3-dimensional printing and injection molding. *Tissue Eng.* 2006; 12:2801–11.
- [64] Livingston T, Ducheyne P, Garino J. In vivo evaluation of a bioactive scaffold for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res.* 2002; 62:1–13.
- [65] Larsson S. Calcium phosphates: what is the evidence? *J. Orthop Trauma.* 2010; 24(3 Suppl):S41–5.

- [66] Beuerlein MJS, McKee MD. Calcium sulfates: what is the evidence? *J. Orthop Trauma*. 2010; 24(Suppl 1):S46–51.
- [67] Bobyn JD, Stackpool G, Toh K-K. Bone ingrowth characteristics and interface mechanics of a new porous tantalum biomaterial. *J Bone Joint Surg*. 1999; 81-B:907–914.
- [68] Hahn H, Palich W. Preliminary evaluation of porous metal surfaced titanium for orthopedic implants. *J Biomed Mater Res*. 1970; Dec;4(4):571–7.
- [69] Brånemark P-I, Hansson BO, Adell R, Breine U, Lindström J, Hallán O, Öhman A. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. *Stockholm: Almqvist and Wiksell*; pp.132. 1977.
- [70] Dorland WA. Dorland's Illustrated Medical Dictionary. *W.b. Saunders Company 32nd Ed.*; 2011.
- [71] Zarb G, Albrektsson T. Osseointegration – a requiem for the periodontal ligament? – An editorial. *Int J Periodont Rest Dentistry*. 1991; 11:88-91.
- [72] Brånemark P-I, Rydevik BL, Skalak R. 1997. Osseointegration in skeletal reconstruction and joint replacement.
- [73] Albrektsson T, Johansson C. 2001. Osteoinduction, Osteoconduction and osseointegration.
- [74] Tsuboi N, Sennerby L, Johansson C, Albrektsson T, Tsuboi Y, Iizika T.1996. Histomorphometric analysis of bone-titanium interface in human retrieved implants. In: Ueda M (ed) Proceedings of the third international congress on tissue integration in oral and maxillofacial reconstruction.
- [75] Gottlander M. On hard-tissue reactions to hydroxyapatite-coated titanium implants. PhD thesis, Dept of Biomaterials/Handicap Research, University of Göteborg, Sweden, pp. 1–192. 1994.
- [76] Wennerberg A.1996. On surface roughness and implant incorporation. PhD thesis, Dept of Biomaterials/Handicap Research, University of Göteborg, Sweden, pp 1–212.
- [77] Nilsson LP, Granström G, Albrektsson T. The effect of hyperbaric oxygen treatment of bone regeneration. An experimental study in the rabbit. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1987; 3:43–48.

- [78] Hutmacher DW, Schantz JT, Lam CXF, Tan KC, Lim TC. State of the art and future directions of scaffold based bone engineering from a biomaterials perspective. *J Tissue Eng Regenerat Med*. 2007; 1:245–60.
- [79] Habraken W, Wolke JGC, Jansen JA. Ceramic composites as matrices and scaffolds for drug delivery in tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev*. 2007; 59:234–48.
- [80] Bauer TW, Geesink RC, Zimmerman R, McMahon JT. Hydroxyapatite-coated femoral stems. Histological analysis of components retrieved at autopsy. *J Bone Joint Surg*. 1991; 73:1439.
- [81] Davies, J. E. The bone material interface. University of Toronto Press., 1990.
- [82] Poinern GE, Brundavanam RK, Mondinos N, Jiang ZT. Synthesis and characterisation of nanohydroxyapatite using an ultrasound assisted method. *Ultrason Sonochem*. 2009; 16:469–74.
- [83] Legeros RZ. Biodegradation and bioresorption of calcium phosphate ceramics. *Clin Mater*. 1993; 14:65–88.
- [84] Vallet-Regí M. 2000. Ceramics for medical applications.
- [85] Bohner M. Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements. *Injury-Int J Care Injured*. 2000; 31:S37–47.
- [86] Johnson AJW, Herschler BA. A review of the mechanical behavior of CaP and CaP/polymer composites for applications in bone replacement and repair. *Acta Biomater*. 2011; 7:16–30.
- [87] Eanes ED. Program Crystal Growth Characteristics. vol. 3, pp. 3-15, 1980.
- [88] Mavropoulos E. 1999. A hidroxiapatita como removedora de chumbo. PhD thesis. Fundação Oswaldo Cruz. Escola Nacional de Saúde Pública e Toxicologia. Rio de Janeiro.
- [89] Zhou H, Lee J. 2011. Nanoscale hydroxyapatite particles for bone tissue engineering.
- [90] Marcacci M, Kon E, Moukhachev V, Lavroukov A, Kutepov S, Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R. 2007. Stem cells associated with macroporous bioceramics for long bone repair: 6- to 7-year outcome of a pilot clinical study.
- [91] Dorozhkin SV. 2010. Bioceramics of calcium orthophosphates.

- [92] Ducheyne P, Radin S, King L. 1993. The effect of calcium-phosphate ceramic composition and structure on in vivo behavior.
- [93] Schepers E, Declercq M, Ducheyne P. 1991. Bioactive glass particulate material as a filler for bone lesions
- [94] Ma PX. Scaffold for tissue fabrication. *Mater Today* 7. 2004 ;30–40.
- [95] Hutmacher DW. Scaffolds in Tissue Engineering Bone and Cartilage. *Biomaterials* 21. 2000; 2529–2543.
- [96] Fulmer MT, Martin RI, Brown PW. Formation of Calcium deficient Hydroxyapatite at near-physiological temperature. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 3. 1992; 299-305.
- [97] Ma QY, Traina SJ, Logan TJ. Lead immobilization from aqueous solutions and Contaminated soils using phosphate rocks. *Environ. Sci. Technol.*, v. 29. 1995; 1118-1126.
- [98] Li J, Fartash B, Hermannsson L. *Biomaterials* 16, Elsevier. 1995; 417–422.
- [99] Bonfield W in: Hench LL, Wilson J (Eds.), An Introduction to Bioceramics, *World Scientific, Singapore*, pp. 299–303. 1993.
- [100] Bellucci D, Sola A, Gazzarri M, Chiellini F, Cannillo V. 2012. A new hydroxyapatite-based biocomposite for bone replacement.
- [101] Santos ML, Florentino AO, Saeki MJ, Aparecida AH, Fook MVL, Guastaldi AC. Síntese de hidroxiapatita pelo método sol-gel utilizando precursores alternativos: nitrato de cálcio e ácido fosfórico. *Eclética Química*.v.30, n.3, pp. 29-35. 2005.
- [102] Costa AC, Lima MG, Lima LH, Cordeiro VV, Viana KM, Souza CV, Lira HL. 2009. Hidroxiapatita: Obtenção, caracterização e aplicações.
- [103] Aoki H. 1991. Science and medical applications of hydroxyapatite.
- [104] Liu DM. Fabrication of hydroxyapatite ceramic with controlled porosity. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 8. pp. 227-232. 1997.
- [105] Legeros RZ. Calcium phosphate materials in restorative dentistry: a review. *Advances in Dental Research*. v. 2. pp.164-180. 1988.

- [106] E'Gues MAM. 2005. Compósito de colágeno com silicato e hidroxiapatita como material para endodontia. PhD Thesis. Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Instituto de Química de São Carlos, USP. São Carlos.
- [107] Rovira A, Bareille R, Lopez I, Rouats F, Bordenave L, Rey C, Rabaud M. Preliminary report on a new composite material made of calcium phosphate, elastin peptides and collagens. *Journal of Materials Science*, v. 4. pp. 372-380. 1993.
- [108] Ito M. In vitro properties of a chitosan-bonded hydroxyapatite bone filling paste. *Biomaterials*. v. 12, n. 1. pp. 41-45. 1991.
- [109] Kazim M. Evaluation of a collagen/hydroxyapatite implant for orbital reconstructive surgery. *Ophthalmic Plastic and Reconstructive Surgery*. v. 8, n. 2. pp. 94-108. 1992.
- [110] Serre CM, Papillard M, Chavassieur P, Boivin G. In vitro induction of a calcifying matrix by biomaterials constituted of collagen and or hydroxyapatite: an ultrastructural comparison of three types of biomaterials. *Biomaterials*. v. 14, n. 2. pp. 97-106. 1993.
- [111] Hemmerle J, Leize M, Voegel JC. Longterm behavior of a hydroxyapatite/collagen glycosaminoglycan biomaterial used for oral surgery: a case report. *Journal Material Science*. v. 6, n. 6. pp. 360-366. 1995.
- [112] Ribeiro NM. 2009. Fibronectin and osteonectin adsorption onto hydroxyapatite nanostructures and its influence on osteoblast adhesion. PhD thesis, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, Portugal.
- [113] Zhou H, Lee J. 2011. Nanoscale hydroxyapatite particles for bone tissue engineering.
- [114] Ayers RA, Simske SJ, Nunes CR, Wolford LM. Long-term bone ingrowth and residual microhardness of porous block hydroxyapatite implants in humans. *J Oral Maxillofacial Surg*. 1998;56:1297–301.
- [115] Vats A, Tolley NS, Polak JM, Gough JE. Scaffolds and biomaterials for tissue engineering: a review of clinical applications. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 2003;28:165–72.
- [116] Hollister SJ, Maddox RD, Taboas JM. Optimal design and fabrication of scaffolds to mimic tissue properties and satisfy biological constraints. *Biomaterials* 2002;23:4095–103.

- [117] LeGeros RZ. Calcium Phosphates in Oral Biology and Medicine, Chap. 6, Myers HM, ed., Karger, Basel. pp.154-157. 1991.
- [118] Chow LC, Sun L. 2004. Properties of Nanostructured Hydroxyapatite Prepared by a Spray Drying Technique.
- [119] Manuel CM, Foster M, Monteiro FJ, Ferraz MP, Doremus RH, Bizios R. Preparation and characterization of calcium phosphate nanoparticles. In: Barbosa MA, Monteiro FJ, Correia R, Leon B, editors. 16th International Symposium on Ceramics in Medicine; 2003 Nov 06-09; Porto, PORTUGAL: *Trans Tech Publications Ltd*; pp. 903-906. 2003.
- [120] Legeros RZ. Biodegradation and bioresorption of calcium phosphate ceramics. *Clin Mater* 1993;14:65–88.
- [121] Stupp SI, Ciegler GW. Organoapatites: materials for artificial bone. I. Synthesis and microstructure. *J Biomed Mater Res* 1992;26:169–83.
- [122] Appleford MR, Oh S, Oh N, Ong JL. In vivo study on hydroxyapatite scaffolds with trabecular architecture for bone repair. *J Biomed Mater Res A* 2009;89:1019–27.
- [123] Cüneyt Tas A. Synthesis of biomimetic Ca-hydroxyapatite powders at 37 °C in synthetic body fluids. *Biomaterials* 21, pp. 1429-1438. 2000.
- [124] Zhang S, Gonsalves KE. Preparation and characterization of thermally stable nanohydroxyapatite, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 8, pp. 25-28. 1997.
- [125] Li YB, deGroot K, Dewijn J, Klein CP, Meer SV. Morphology and composition of nanograde calcium phosphate needle-like crystals formed by simple hydrothermal treatment. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 5, pp. 326-331. 1994.
- [126] Chai CS, Ben-Nissan B. Bioactive nanocrystalline sol-gel hydroxyapatite coatings, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 10, pp. 465-469. 1999.
- [127] Layrolle P, Ito A, Tateishi T, Sol-gel synthesis of amorphous calcium phosphate and sintering into microporous hydroxyapatite bioceramics, *J. Amer. Ceram. Soc.* 81, pp. 1421- 1428. 1998.
- [128] Bose S, Saha SK, Synthesis and characterization of hydroxyapatite nanopowders by emulsion technique, *Chem. Mater.* 15, pp. 4464-4469. 2003.
- [129] Lim GK, Wang J, Ng SC, Gan LM, Formation of nanocrystalline hydroxyapatite in nonionic surfactant emulsion, *Langmuir* 15, pp. 7472-7477. 1999.

- [130] Yeong KC, Wang J, Ng SC, Mechanochemical synthesis of nanocrystalline hydroxyapatite from CaO and CaHPO<sub>4</sub>, *Biomaterials* 22, pp. 2705-2712. 2001.
- [131] Silva CC, Pinheiro AG, Miranda MA, Goes JC, Sombra AS, Structural properties of hydroxyapatite obtained by mechanosynthesis, *Solid State Sci.* 5, pp. 553-558. 2003.
- [132] Shirkhanzadeh M, Direct formation of nanophase hydroxyapatite on cathodically polarized electrodes, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 9, pp. 67-72. 1998.
- [133] McDonagh MS, Carson S, Thakurta S. 2009. Drug Class Review Proton Pump Inhibitors.
- [134] Sachs G, Shin JM, Howden CW. 2006. Review article: the clinical pharmacology of proton pump inhibitors.
- [135] Sachs G. Physiology of the parietal cell and therapeutic implications. *Pharmacotherapy* 2003; 23: 68S–73S.
- [136] Hatlebakk JG, Berstad A. Pharmacokinetic optimisation in the treatment of gastro-oesophageal reflux disease. *Clin Pharmacokinet* 1996; 31 : 386–406.
- [137] Andersson K, Carlsson E. Potassiumcompetitive acid blockade: a new therapeutic strategy in acid-related diseases. *Pharmacol Ther* 2005; 108 : 294–307.
- [138] Lindberg P, Nordberg P, Alminger T, Brandstrom A, Wallmark B. The mechanism of action of the gastric acid secretion inhibitor omeprazole. *J Med Chem* 1986; 29:1327–9.
- [139] Shin JM, Choo YM, Sachs G. Chemistry of covalent inhibition of the gastric (H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase by proton pump inhibitors. *J Am Chem Soc* 2004; 126:7800–11.
- [140] Nordin BE. Calcium and osteoporosis. *Nutrition.* 1997; 13:664-686.
- [141] Sheikh MS, Santa Ana CA, Nicar MJ, Schiller LR, Fordtran JS. Gastrointestinal absorption of calcium from milk and calcium salts. *N Engl J Med.* 1987; 317:532-536.
- [142] Chonan O, Takahashi R, Yasui H, Watanuki M. Effect of L-lactic acid on calcium absorption in rats fed omeprazole. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 1998; 44: 473-481.
- [143] Chonan O, Takahashi R, Yasui H, Watanuki M. Effect of L-lactic acid on the absorption of calcium in gastrectomized rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 1998;44:869-875.

- [144] Yang Y-X, Lewis JD, Epstein S, Metz DC . 2006. Long-term Proton Pump Inhibitor Therapy and Risk of Hip Fracture.
- [145] Serfaty-Lacrosniere C, Wood RJ, Voytko D, *et al.* Hypochlorhydria from short-term omeprazole treatment does not inhibit intestinal absorption of calcium, phosphorus, magnesium or zinc from food in humans. *J Am Coll Nutr.* 1995;14:364-368.
- [146] O'Connell MB, Madden DM, Murray AM, Heaney RP, Kerzner LJ. Effects of proton pump inhibitors on calcium carbonate absorption in women: a randomized crossover trial. *Am J Med.* 2005; 118:778-781.
- [147] Malen CE, Danree BH. New thiocarboxamides derivatives with specific gastric antisecretory properties. *J. Med. Chem.* 1971;14, 244–246.
- [148] Fellenius E. *et al.* Substituted benzimidazoles inhibit gastric acid secretion by blocking (H<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)ATPase. *Nature* 290, 159–161 (1981). A key paper in the elucidation of the mechanism of action of substituted benzimidazoles, such as omeprazole.
- [149] Wallmark B, Sachs G, Mardh S, Fellenius E. Inhibition of (H<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-ATPase by the substituted benzimidazole, picroprazole. *Biochem. Biophys. Acta* 1983;728, 31–38.
- [150] Lindberg P. *et al.* Omeprazole, the first proton pump inhibitor. *Med. Res. Rev.* 10, 1–54 (1990). A comprehensive review on omeprazole.
- [151] Lind T, Cederberg C, Ekenved G, Haglund U, Olbe L. Effect of omeprazole – a gastric proton pump inhibitor – on pentagastrin stimulated acid secretion in man. *Gut* 1983;24, 270–276.
- [152] Lauritsen K *et al.* Effect of omeprazole and cimetidine on duodenal ulcer. A double blind comparative trial. *N. Engl. J. Med.* 1985; 312, 958–961.
- [153] Gedda K *et al.* Turnover of the gastric H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-adenosine triphosphatase  $\alpha$ -subunit and its effect on inhibition of rat gastric acid secretion. *Gastroenterology* 1995; 109, 1134–1141.
- [154] Lindberg P, Nordberg P, Alminger T, Brandstrom A, Wallmark B. The mechanism of action of the gastric acid secretion inhibitor omeprazole. *J. Med. Chem.* 29, 1327–1329 (1986).
- [155] Besancon M. *et al.* Membrane topology and omeprazole labeling of the gastric H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-adenosine triphosphatase. *Biochemistry* 1993; 32, 2345–2355.



- [156] Olbe L, Carlsson E, Lindberg P. 2003. A proton-pump inhibitor expedition: The case histories of omeprazole and esomeprazole.
- [157] Aubin JE. Osteoclast adhesion and resorption: the role of podosomes. *Journal of Bone and Mineral Research* 1992; 7:365–8.
- [158] Qin A, Cheng TS, Pavlos NJ, Lin Z, Dai KR, Zheng MH. 2012. V-ATPases in osteoclasts: Structure, function and potential inhibitors of bone resorption.
- [159] Blair HC, Teitelbaum SL, Ghiselli R, Gluck S. Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump. *Science* 1989; 245:855–7.
- [160] Henriksen K, Gram J, Schaller S, Dahl BH, Dziegiel MH, Bollerslev J, *et al.* Characterization of osteoclasts from patients harboring a G215R mutation in CLC-7 causing autosomal dominant osteopetrosis type II. *American Journal of Pathology* 2004; 164:1537–45.
- [161] Blair HC, Athanasou NA. Recent advances in osteoclast biology and pathological bone resorption. *Histology and Histopathology* 2004; 19:189–99.
- [162] Doblare M, Garcia JM, Gomez MJ. 2003. Modelling bone tissue fracture and healing: a review.
- [163] Watkins BA, Hutchins H, Li Y, Seifert MF. 2010. The endocannabinoid signaling system: a marriage of PUFA and musculoskeletal health.
- [164] Espinosa HD, Rim JE, Barthelat F, Buehler MJ. 2009. Merger of structure and material in nacre and bone – Perspectives on de novo biomimetic materials.
- [165] McGee-Lawrence ME, Westendorf JJ. 2010. Histone deacetylases in skeletal development and bone mass maintenance.
- [166] Novack DV, Teitelbaum SL. 2007. The Osteoclast: Friend or Foe?
- [167] Sanz-Reig J, Lizaaur-Utrilla A, Llamas-Merino I. 2011. Uncemented Meridian femoral stem results: A prospective study of 109 cases.
- [168] Bertazzo S, Zambuzzi WF, Campos DD, Ogeda TL, Ferreira CV, Bertran CA. 2010. Hydroxyapatite surface solubility and effect on cell adhesion.
- [169] GuanFeng Yao, HaoTian Feng, YanLing Cai, WeiLi Qi, KangMei Kong. 2007. Characterization of vacuolar-ATPase and selective inhibition of vacuolar-H(+)-ATPase in osteoclasts.

- [170] Kanichiro Kobayashi *et al.* 2000. Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  Stimulates Osteoclast Differentiation by a Mechanism Independent of the ODF/RANKL–RANK Interaction.
- [171] Soysa and Alles. 2009. NF- $\kappa$ B functions in osteoclasts.
- [172] Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr. Rev.* 22. 2001; 2:153–83.
- [173] Xiaotong *et al.* 2002. p38 MAPK-Mediated Signals Are Required for Inducing osteoclast differentiation but not for osteoclast function.
- [174] Hiroshi Kaji. 1996. Prostaglandin E2 Stimulates osteoclast-like cell formation and bone resorbing activity via osteoblasts - role of cAMP-dependent protein kinase.
- [175] Ikuko Take. 2005. Prostaglandin E2 strongly inhibits human osteoclast formation.
- [176] Kong YY *et al.* Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature.* 1999; 402, 304-309.
- [177] Roodman GD. Cell biology of the osteoclast. *Exp. Hematol.* 1999; 27, 1229-1241.
- [178] Takayanagi *et al.* 2000. T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN- $\gamma$ .
- [179] Kontoyiannis D, Kollias G. Fibroblast biology. Synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis: leading role or chorus line? *Arthritis Res* 2000; 2:342e3.
- [180] Dickerson *et al.* 2012. Rheumatoid and pyrophosphate arthritis synovial fibroblasts induce osteoclastogenesis independently of RANKL, TNF and IL-6.
- [181] Mone Zaidi. 1990. Modularity of Osteoclast Behaviour and "Mode-specific" Inhibition of Osteoclast Function.
- [182] Sheraly AR, Lickorish D, Sarraf F, Davies JE. 2009. Use of Gastrointestinal Proton Pump Inhibitors to Regulate Osteoclast- Mediated Resorption of Calcium Phosphate Cements In Vivo.
- [183] Rzeszutek K, Sarraf F, Davies JE. 2003. Proton pump inhibitors control osteoclastic resorption of calcium phosphate implants and stimulate increased local reparative bone growth.
- [184] Q. Zhao, J. Shao, W. Chen and Y.-P. Li, "Osteoclast differentiation and gene regulation", *Frontiers in Bioscience*, vol. 12, pp. 2519-2529, 2007.

- [185] Toshihiko Hirano. 2007. Cellular pharmacodynamics of immunosuppressive drugs for individualized medicine.
- [186] T. Histing *et al.* 2012. Pantoprazole, a Proton Pump Inhibitor, Delays Fracture Healing in Mice.
- [187] Ferron GM, McKeand W, Mayer PR. 2001. Pharmacodynamic modeling of pantoprazole's irreversible effect on gastric acid secretion in humans and rats. *J Clin Pharmacol* 41:149–156.
- [188] Graziani G, Como G, Badalamenti S *et al.* 1995. Effect of gastric acid secretion on intestinal phosphate and calcium absorption in normal subjects. *Nephrol Dial Transplant* 10:1376–1380.
- [189] Targownik LE, Lix LM, Metge CJ *et al.* 2008. Use of proton pump inhibitors and risk of osteoporosis-related fractures. *CMAJ* 179:319–326.
- [190] Yu EW, Blackwell T, Ensrud KE *et al.* 2008. Acid-suppressive medications and risk of bone loss and fracture in older adults. *Calcif Tissue Int* 83:251–259.
- [191] Tucker KL, Hannan MT, Qiao N *et al.* 2005. Low plasma vitamin B12 is associated with lower BMD: the Framingham Osteoporosis Study. *J Bone Miner Res* 20:152–158.
- [192] Farina C, Gagliardi S. 2002. Selective inhibition of osteoclast vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. *Curr Pharm Des* 8:2033–2048.
- [193] Tuukkanen J, Väänänen HK. 1986. Omeprazole, a specific inhibitor of H<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase, inhibits bone resorption in vitro. *Calcif Tissue Int* 38:123–125.
- [194] Mizunashi K, Furukawa Y, Katano K, Abe K. 1993. Effect of omeprazole, an inhibitor of H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase, on bone resorption in humans. *Calcif Tissue Int* 53:21–25.
- [195] Daniel O. Costa *et al.* 2013. The differential regulation of osteoblast and osteoclast activity by surface topography of hydroxyapatite coatings.
- [196] Ye X, Liu H, Wu C, Qin Y, Zang J, Gao Q, Zhang X & He J. 2011. Proton pump inhibitor therapy and risk of hip fracture: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 23, 794–800.
- [197] Voelker R. 2010. Proton pump inhibitors linked to fracture risk. *JAMA* 304, 29.

- [198] Vestergaard P, Rejnmark L & Mosekilde L. 2006. Proton pump inhibitors, histamine H<sub>2</sub> receptor antagonists, and other antacid medications and the risk of fracture. *Calc Tissue Int* 79, 76–83.
- [199] Corley DA, Kubo A, Zhao W & Quesenberry C. 2010. Proton pump inhibitors and histamine-2 receptor antagonists are associated with hip fractures among at-risk patients. *Gastroenterology* 139, 93–101.
- [200] Targownik LE, Lix LM, Leung S & Leslie WD. 2010. Proton-pump inhibitor use is not associated with osteoporosis or accelerated bone mineral density loss. *Gastroenterology* 138, 896–904.
- [201] Hansen KE, Jones AN, Lindstrom MJ, Davis LA, Ziegler TE, Penniston KL, Alvig AL & Shafer MM. 2010. Do proton pump inhibitors decrease calcium absorption? *J Bone Miner Res* 25, 2786–2795.
- [202] Wright MJ, Sullivan RR, Gaffney-Stomberg E, Caseria DM, O’Brien KO, Proctor DD, Simpson CA, Kerstetter JE & Insogna KL. 2010. Inhibiting gastric acid production does not affect intestinal calcium absorption in young, healthy individuals: a randomized, crossover, controlled clinical trial. *J Bone Miner Res* 25, 2205–2211.
- [203] Zaidi M. 2007. Skeletal remodeling in health and disease. *Nat Med* 13, 791–801.
- [204] Carmo, SCF. 2012. Comportamento osteoclástico na superfície de hidroxiapatite micro e nanoestruturada. PhD thesis, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, Portugal.
- [205] Detsch. 2010. The resorption of nanocrystalline calcium phosphates by osteoclast-like cells.
- [206] Costa-Rodrigues, J. *et al.* 2013. Dose-dependent inhibitory effects of proton pump inhibitors on human osteoclastic and osteoblastic cell activity.
- [207] Cottrell JA, Vales FM, Schachter D, Wadsworth S, Gundlapalli R, Kapadia R & O’Connor JP. 2010. Osteogenic activity of locally applied small molecule drugs in a rat femur defect model. *J Biomed Biotechnol* 2010, 597641.
- [208] Narisawa S, Harmey D, Yadav MC, O’Neill WC, Hoylaerts MF & Millan JL. 2007. Novel inhibitors of alkaline phosphatase suppress vascular smooth muscle cell calcification. *J Bone Miner Res* 22, 1700–1710.
- [209] Delomenede M, Buchet R & Mebarek S. 2009. Lansoprazole is an uncompetitive inhibitor of tissue nonspecific alkaline phosphatase. *Acta Biochim Pol* 56, 301–305.

- [210] Hyun JJ, Chun HJ, Keum B, Seo YS, Kim YS, Jeon YT, Lee HS, Um SH, Kim CD, Ryu HS, *et al.* 2010. Effect of omeprazole on the expression of transcription factors in osteoclasts and osteoblasts. *Int J Mol Med* 26, 877–883.
- [211] Costa-Rodrigues J, Fernandes A & Fernandes MH. 2011. Spontaneous and induced osteoclastogenic behaviour of human peripheral blood mononuclear cells and their CD14(+) and CD14(–) cell fractions. *Cell Proliferat* 44, 410–419.
- [212] Andersson T, Holmberg J, Rohss K & Walan A. 1998. Pharmacokinetics and effect on caffeine metabolism of the proton pump inhibitors, omeprazole, lansoprazole, and pantoprazole. *Br J Clin Pharmacol* 45, 369–375.
- [213] Junghard O, Hassan-Alin M & Hasselgren G. 2002. The effect of the area under the plasma concentration vs time curve and the maximum plasma concentration of esomeprazole on intragastric pH. *Eur J Clin Pharmacol* 58, 453–458.
- [214] Mattsson JP, Vaananen K, Wallmark B & Lorentzon P. 1991. Omeprazole and bafilomycin, two proton pump inhibitors: differentiation of their effects on gastric, kidney and bone H(+)-translocating ATPases. *Biochim Biophys Acta* 1065, 261–268.
- [215] Matsuo K & Irie N. 2008. Osteoclast–osteoblast communication. *Arch Biochem Biophys* 473, 201–209.
- [216] Breitzkreutz I, Raab MS, Vallet S, Hideshima T, Raje N, Chauhan D, Munshi NC, Richardson PG & Anderson KC. 2007. Targeting MEK1-2 blocks osteoclast differentiation, function and cytokine secretion in multiple myeloma
- [217] Soysa NS, Alles N, Aoki K & Ohya K. 2012. Osteoclast formation and differentiation - An overview.
- [218] Hotokezaka H, Sakai E, Kanaoka K, Saito K, Matsuo K, Kitaura H, Yoshida N & Nakayama K. 2002. U0126 and PD98059, specific inhibitors of MEK, accelerate differentiation of RAW264.7 cells into osteoclast-like cells.
- [219] Wagner EF, Matsuo K. 2003. Signalling in osteoclasts and the role of Fos-API1 proteins.
- [220] Horowitz MC, Xi Y, Wilson K, Kacena MA. 2001. Control of osteoclastogenesis and bone resorption by members of the TNF family of receptors and ligands.